

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

В. Г. АРТЮХОВ, М. А. НАКВАСИНА

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ
МЕМБРАНЫ:
структурная организация,
функции, модификация
физико-химическими
агентами**

*Допущено Министерством образования
Российской Федерации
в качестве учебного пособия для студентов
высших учебных заведений, обучающихся
по специальности "Биология"*

Издательство
Воронежского государственного университета
2000

УДК 577.15:577.353

Артюхов В.Г., Наквасина М.А. Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами: Учеб. пособие. – Воронеж: Издательство Воронежского государственного университета, 2000. — 296 с.

ISBN 5-7455-1162-1

В учебном пособии, подготовленном на базе спецкурсов “Биофизика мембран” и “Молекулярная фотобиология”, представлены современные воззрения о составе и структурно-функциональной организации биомембран, путях передачи информации в клетке, роли мембранных компонентов в осуществлении и регулировании метаболических процессов. Обсуждаются молекулярные механизмы функционирования биомембран в норме и в условиях воздействия модифицирующих агентов (УФ- и ионизирующих излучений, химических соединений), а также вопросы развития патологических состояний организма, связанных с накоплением активных форм кислорода.

Издание предназначено для студентов, магистров и аспирантов биологических факультетов университетов, а также может быть использовано студентами медицинских, фармацевтических и сельскохозяйственных вузов.

Ил. 62. Табл. 21. Библиогр.; 89 назв.

Рецензенты:

кафедра биофизики биологического факультета

Московского государственного университета

(зав. кафедрой — д-р биол. наук, член-кор. РАН, проф. *А. Б. Рубин*),

д-р биол. наук, проф. *В. Л. Зима*

(Киевский государственный университет)

Artyukhov V.G., Nakvasina M.A. Biological membranes: structural organization, functions, modification by physical and chemical agents. — Voronezh: Voronezh University Press, 2000. — 296 p.

This textbook focuses on the modern views concerning composition, structural and functional organization of biological membranes, the ways of information transmission in the cell, and role of membrane components in realization and regulation of the metabolism. Other aspects described include molecular mechanisms of biomembranes functioning in the normal state and under the influence of a number of modifying agents (UV- and ionizing radiation, chemical substances). Particular attention is given to the role of active forms of oxygen in developing of some human pathologies.

Fig. 62. Tabl. 21. Bibl.: 89.

ISBN 5-7455-1162-1

© Артюхов В.Г., Наквасина М.А., 2000

© Издательство Воронежского
государственного университета, 2000

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	7
Глава 1. Состав и структурно-функциональная организация молекулярных компонентов биомембран	11
1.1. Липиды биомембран: классификация, состав, структура, физико-химические и динамические свойства, функции	11
1.1.1. Классификация, состав и структура липидов мембран	11
1.1.2. Физико-химические и динамические свойства и функции липидов мембран	19
1.2. Мембранные белки	26
1.2.1. Классификация, структура и функции мембранных белков	26
1.2.2. Цитоскелет (мембранный каркас)	31
1.2.3. Интегральные белки биомембран	34
1.2.4. Структура, функциональные и некоторые физико-химические свойства Na^+ , K^+ -АТФазы	35
1.2.5. Структура, функциональные и некоторые физико-химические свойства ацетилхолинэстеразы	50
1.3. Углеводы мембран	56
1.4. Типы взаимодействий мембранных компонентов и их роль в функционировании биомембран	58
Контрольные вопросы	62
Глава 2. Участие компонентов биомембран в осуществлении и регулировании метаболических процессов	64
2.1. Общая характеристика процессов передачи информации в клетке	64
2.1.1. Особенности структуры и функций мембранных рецепторов	65
2.1.2. Аденилатциклазный путь передачи сигнала	71
2.1.3. Фосфоинозитидный путь передачи информации	72
2.2. Роль ионов в осуществлении метаболических процессов с участием мембран	74
2.3. Молекулярные механизмы интеграции клеточного метаболизма	78
2.3.1. Механизмы регулирования функциональной активности ферментов и ферментных систем в клетке	78
2.3.2. Адсорбционный механизм регуляции метаболизма: понятие о метаболоне, его структура, физиологическое значение образования	82
2.3.3. Пути регулирования активности векторных ферментов биомембран	91
2.3.4. Молекулярные механизмы нейрогуморальной регуляции функций клеток	97

Контрольные вопросы	100
Глава 3. Механизмы модификации компонентов биомембран при патологических состояниях: роль кислородных метаболитов	102
3.1. Пероксидное окисление липидов как один из ключевых механизмов модификации структурно-функционального состояния биомембран	102
3.2. Роль активных форм кислорода в регулировании метаболических процессов в биосистемах	107
3.3. Пути регулирования уровня свободнорадикальных продуктов и активных кислородных метаболитов	114
Контрольные вопросы	124
Глава 4. Структурно-функциональные модификации молекулярных компонентов биомембран под воздействием физико-химических агентов	126
4.1. Фотохимические и радиационно-химические превращения компонентов биомембран в условиях различного микроокружения	126
4.1.1. Структурно-функциональные модификации молекулярных компонентов биомембран под действием УФ-излучения ..	126
4.1.2. Радиационно-химические превращения структурных компонентов биомембран	142
4.2. УФ-индуцированные изменения структурно-функционального состояния мембраносвязанных ацетилхолинэстеразы и Na^+ , K^+ -АТФазы в присутствии некоторых химических модификаторов ...	149
4.2.1. Функциональная активность мембраносвязанной ацетилхолинэстеразы после УФ-облучения в присутствии бензилового спирта и конканавалина А	149
4.2.2. Фоточувствительность ацетилхолинэстеразы эритроцитарных мембран в присутствии фосфолипазы D и аскорбиновой кислоты	157
4.2.3. УФ-индуцированные изменения функциональных свойств мембраносвязанной Na^+ , K^+ -АТФазы в присутствии фосфолипазы D	169
4.3. Функциональные свойства лактатдегидрогеназы в комплексе с эритроцитарными мембранами и их компонентами в интактном состоянии и после УФ-облучения	172
4.4. Исследование роли активных форм кислорода в процессах УФ-модификации лактатдегидрогеназы	184
Контрольные вопросы	200
Глава 5. Характеристика некоторых методов изучения биологических мембран	202
5.1. Краткий обзор групп методов исследования биомембран	202
5.2. Выделение и разделение мембран	217

5.3. Оценка чистоты мембранных фракций	222
5.4. Выделение и очистка мембранных белков	223
5.5. Выделение и фракционирование липидов мембран	227
Контрольные вопросы	228
Глава 6. Исследование структурно-функционального	
состояния отдельных компонентов биомембран в	
норме и при воздействии различных физико-хими-	
ческих факторов	
6.1. Выделение эритроцитарных мембран	230
Лабораторная работа № 1. Выделение эритроцитарных	
мембран из крови доноров	231
Лабораторная работа № 2. Определение концентрации белка	
плазматических мембран по методу Лоури	232
Лабораторная работа № 3. Количественное определение белка	
по биуретовой реакции	235
6.2. Исследование функциональной активности мембраносвязан-	
ных ферментов в норме и при воздействии физико-химических	
факторов	236
Лабораторная работа № 4. Определение функциональной актив-	
ности ацетилхолинэстеразы эритроцитарных мембран	237
Лабораторная работа № 5. Исследование УФ-индуцированных	
изменений функциональной активности ацетилхолинэсте-	
разы эритроцитарных мембран	238
Лабораторная работа № 6. Исследование ферментативной	
активности свободной и мембраносвязанной ацетилхолин-	
эстеразы в интактном состоянии и после УФ-облучения	240
Лабораторная работа № 7. Определение функциональной	
активности ацетилхолинэстеразы эритроцитарных мембран	
после индукции пероксидного окисления липидов	240
Лабораторная работа № 8. Исследование функциональной	
активности мембраносвязанной Na^+ , K^+ -АТФазы	241
Лабораторная работа № 9. Изучение УФ-индуцированных	
изменений функциональных свойств Na^+ , K^+ -АТФазы	
эритроцитарных мембран	243
Лабораторная работа № 10. Определение ферментативной	
активности Na^+ , K^+ -АТФазы эритроцитарных мембран	
после индукции пероксидного окисления липидов	245
6.3. Исследование интенсивности протекания процесса пероксид-	
ного окисления липидов мембран	245
Лабораторная работа № 11. Определение уровня продуктов	
пероксидного окисления липидов мембран с использова-	
нием тиобарбитуровой кислоты	246
6.4. Изучение изменений структурного состояния биологических	
мембран методом флуоресцентных зондов	248

Лабораторная работа № 12. Исследование фотоиндуцированных изменений структурного состояния эритроцитарных мембран методом флуоресцентных зондов	250
6.5. Исследование устойчивости эритроцитарных мембран к действию различных химических агентов при помощи метода регистрации осмотических и кислотных эритрограмм ...	252
Лабораторная работа № 13. Автоматический метод регистрации осмотических и кислотных эритрограмм	253
6.6. Количественное определение липидного состава эритроцитов ...	256
Лабораторная работа № 14. Определение фосфолипидов эритроцитарных мембран методом тонкослойной хроматографии....	257
6.7. Определение функциональной активности некоторых антиоксидантных ферментов крови	260
Лабораторная работа № 15. Исследование каталитической активности супероксиддисмутазы в эритроцитах крови доноров	260
Лабораторная работа № 16. Определение активности каталазы в эритроцитах крови человека спектрофотометрическим методом	262
Лабораторная работа № 17. Исследование функциональной активности глутатионредуктазы эритроцитов	264
6.8. Изучение участия активных форм кислорода в процессах УФ-модификации белковых молекул	265
Лабораторная работа № 18. Исследование каталитической активности лактатдегидрогеназы спектрофотометрическим методом	267
Лабораторная работа № 19. Выделение лактатдегидрогеназы из сердца свиньи	269
Лабораторная работа № 20. Исследование изоферментного спектра лактатдегидрогеназы методом электрофореза в полиакриламидном геле	271
Лабораторная работа № 21. Исследование УФ-чувствительности лактатдегидрогеназы в присутствии некоторых модифицирующих агентов	273
Контрольные вопросы	274
Список основной литературы	276
Список дополнительной литературы	277
Программа спецкурса «Биофизика мембран»	282
ПРИЛОЖЕНИЯ	285
Качественный и количественный состав липидов различных организмов	285
Приготовление буферных растворов	288
Предметный указатель	290

ПРЕДИСЛОВИЕ

Мембранология — современная, стремительно развивающаяся междисциплинарная область естественных наук, находящаяся на стыке биофизики, биохимии, молекулярной биологии, иммунологии, физиологии, генетики, физической и коллоидной химии и др. Она изучает состав, структуру, свойства, функции, локализацию компонентов биологических мембран, их молекулярную и динамическую организацию, особенности межмолекулярных взаимодействий и фазовые переходы липидов и белков в мембране, транспорт веществ через мембраны, участие биомембран в осуществлении и регулировании метаболических процессов в клетке, механизмы действия различных физико-химических факторов на мембранные системы и другие вопросы, связанные с исследованием состояния компонентов биомембран и отдельных клеток.

Одним из центральных разделов мембранологии является биофизика мембран, которая рассматривает, прежде всего, физико-химические механизмы их функционирования в норме и в условиях воздействия разнообразных модифицирующих агентов, а также при развитии патологических состояний отдельных систем организма человека. Спецкурс “Биофизика мембран” в объеме 24 ч читается студентам 4-го и 5-го курсов кафедры биофизики и биотехнологии дневного и вечернего отделений биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета. Однако невозможно освоить программу этого курса без глубокого изучения других разделов мембранологии. Ограниченный объем учебных часов не позволяет подробно рассмотреть многие аспекты мембранологии как междисциплинарной области знаний. Многие вопросы программы курса мембранологии отражены в ряде монографий, учебников, научных обзоров ведущих отечественных и зарубежных специалистов (В. Г. Ивков, Г. Н. Берестовский, 1981; 1982; В. Ф. Антонов, 1982; Я. Кагава, 1985; В. А. Твердислов и соавт., 1986; С. В. Конев, 1987; А. А. Болдырев, 1985, 1998; В. П. Скулачев, 1989; З. И. Крутецкая, А. В. Лонский, 1994; Р. Геннис, 1997, и др.), которые заложили фундамент преподавания в вузах этой важнейшей научной дисциплины. Вместе с тем ряд учебников и учебных пособий по биофизике и мембранологии не содержит разделов, посвященных пробле-

мам, касающимся выявления ключевой роли биологических мембран в осуществлении и регулировании различных метаболических процессов в норме и в условиях воздействия различных физико-химических факторов, в развитии патологических состояний организма человека, а также проявлении терапевтического действия эффективных методов лечения — аутоотрансфузии УФ-облученной крови (АУФОК) и эндоваскулярного лазерного облучения крови (ЭЛОК), широко используемых в современной медицинской практике. Следует отметить, что библиотеки многих, в том числе и известных в стране высших учебных заведений (университетов), не могут обеспечить возрастающие научные потребности аспирантов, магистров, студентов-биофизиков и биохимиков, обучающихся на дневном, вечернем и заочном отделениях и выполняющих курсовые и дипломные работы, направленные на выявление молекулярных механизмов функционирования биополимеров и их надмолекулярных комплексов. Кроме того, проведение “Большого практикума” в рамках учебного плана подготовки биолога-биофизика предусматривает выполнение ряда лабораторных работ, связанных с изучением мембранных структур, что требует не только знания принципов современных физико-химических методов анализа биосистем, но и теоретических основ той или иной научной проблемы мембранологии.

Настоящее учебное пособие является дальнейшим развитием и существенным дополнением к разделу “Мембранология” учебника по биофизике, написанного коллективом авторов кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета (В. Г. Артюхов, Т. А. Ковалева, В. П. Шмелев, 1994). В нем более детально изложены вопросы, касающиеся структурно-функциональной организации молекулярных компонентов биомембран, в том числе и с точки зрения участия последних в осуществлении процессов клеточного метаболизма (глава 1). Большое внимание уделено рассмотрению проблем передачи информации в клетке и роли биомембран в регулировании активности важнейших ферментов и ферментных систем (на примере адсорбционного механизма регуляции гликолитического комплекса). Представлены современные воззрения о взаимосвязи механизмов интеграции метаболических процессов, нейрогуморальной регуляции функций клеток, путях регулирования векторных ферментов

биомембран (глава 2). Глава 3 посвящена проблеме выяснения молекулярных механизмов модификации компонентов биомембран при патологических состояниях организма: рассмотрена ведущая роль пероксидного окисления мембранных липидов; подробно охарактеризованы активные формы кислорода, их свойства, биологическое действие, процессы образования и пути их утилизации, значение в реализации внутриклеточного механизма редокс-регуляции метаболизма; описаны классификация, свойства и механизмы функционирования антиоксидантных систем организма как регуляторов уровня свободнорадикальных продуктов и активных кислородных метаболитов. В главе 4 изложены вопросы, касающиеся исследования закономерностей функционирования биомембран и их компонентов в условиях воздействия различных физико-химических факторов (УФ- и ионизирующей радиации, химических агентов). Пособие содержит и материалы собственных исследований авторов, посвященных изучению фотоиндуцированных изменений структурно-функционального состояния компонентов биомембран (ацетилхолинэстеразы, Na^+ , K^+ -АТФазы эритроцитарных мембран, лактатдегидрогеназы в комплексе с эритроцитарными мембранами и их компонентами) в норме и после воздействия УФ-излучения в условиях различного микроокружения. Глава 5 включает обзор методов изучения биомембран, а в главе 6 представлено описание 21 лабораторной работы, которые проводятся в рамках “Большого практикума” и предусматривают не только решение задач учебного плана (т.е. освоение студентами методов и методик), но и обсуждение ряда научно-исследовательских проблем, связанных с интерпретацией полученных результатов, установлением причинно-следственных связей, выдвижением рабочих гипотез.

В конце каждой главы приведены контрольные вопросы, а в конце учебного пособия — список основной и дополнительной литературы, учебная программа спецкурса “Биофизика мембран”. В приложении даны таблицы, материал которых дополняет сведения главы 1 о качественном и количественном составе липидов биомембран различных организмов.

Авторы надеются, что настоящее учебное пособие расширит объем обязательного учебного материала, предназначенного для изучения студентами в рамках спецкурсов “Биофизика мембран” и “Фотобиология”, “Большого практикума” и общего кур-

са биофизики, поможет студентам, магистрам и аспирантам биологических, химических, медицинских специальностей глубже освоить теоретические основы мембранологии, получить представление о современном уровне исследований в данной области, ознакомиться с ее фундаментальными проблемами, методами их разработки, источниками современной учебно-научной литературы, а также приобрести навыки работы с мембранными препаратами.

Авторы выражают глубокую благодарность зав. кафедрой биофизики биологического факультета Московского государственного университета, члену-корреспонденту РАН, профессору А. Б. Рубину и профессору кафедры биофизики Киевского государственного университета В. Л. Зиме за труд по рецензированию учебного пособия и ценные замечания, а также сотруднику кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета К. П. Пенскому за большую помощь в подготовке рукописи к изданию.

Глава 1

СОСТАВ И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПОНЕНТОВ БИОМЕМБРАН

1.1. ЛИПИДЫ БИОМЕМБРАН: КЛАССИФИКАЦИЯ, СОСТАВ, СТРУКТУРА, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И ДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ФУНКЦИИ

1.1.1. Классификация, состав и структура липидов мембран

Липиды — обширный класс химических соединений, содержащих алифатические или ароматические углеводородные группы, плохо растворимых в воде в мономерной форме. Липиды подразделяют на 3 класса: нейтральные, амфифильные или дифильные, жирорастворимые витамины. К нейтральным относятся жиры (ди- и триацилглицериды), воска (смесь длинноцепочечных парафинов, спиртов и эфиров спиртов и жирных кислот), каротиноиды и стероиды. Они хорошо растворимы в неполярных растворителях, таких, как *n*-алканы и бензол; в обычных условиях не способны к образованию в воде ламеллярных структур. Амфифильные (дифильные) липиды малорастворимы и в неполярных растворителях (*n*-алканах, бензоле, четыреххлористом углероде). При небольших концентрациях они формируют мицеллы и бислойные структуры. К ним относят фосфолипиды и гликолипиды, жирные кислоты и их соли, моноацилглицериды, длинноцепочечные амиды.

В состав клеточных мембран прокариотических и эукариотических организмов в основном входят амфифильные фосфо- и гликолипиды, в плазматических мембранах эукариот содержатся в значительных количествах стероиды. Большинство нейтральных липидов присутствует в мембранах в качестве продуктов метаболизма и, по-видимому, слабо влияет на структурно-функциональную организацию клеточных мембран. Жирорастворимые витамины А, Д, Е и К благодаря небольшой полярной группе и протяженной углеводородной части хорошо встраиваются в мембрану, однако их роль в функционировании мембранных структур изучена далеко не полностью. Известно, что витамины группы Е (токоферолы) представляют собой антиоксиданты (глава 3) и тем самым стабилизируют липидный бислой. Фосфолипиды, гликолипиды и стероиды, составляющие основную часть липидного компонента мембран различных организмов, называют структурообразующими (рис. 1).

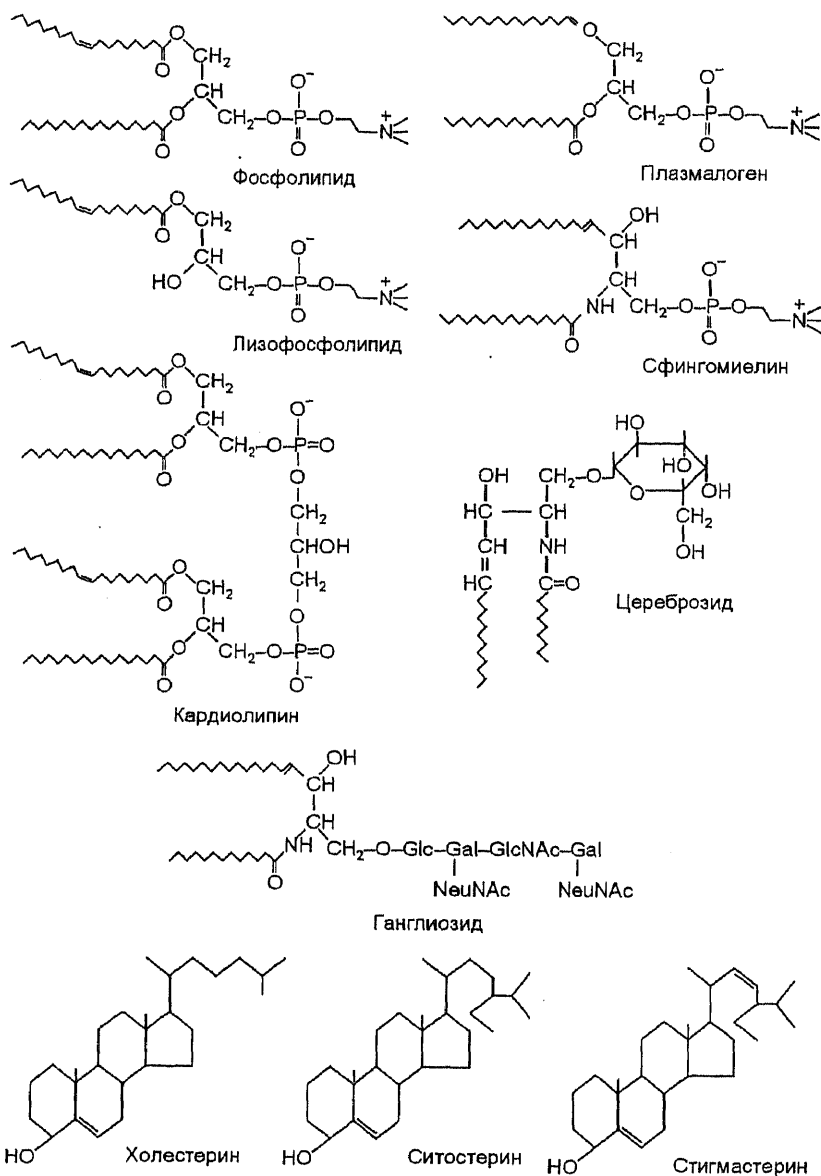
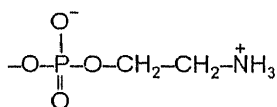
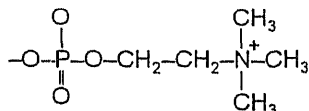


Рис. 1. Структурные формулы соединений некоторых классов мембранных липидов

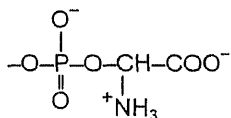
Обозначения: Gal — галактоза; Glc — глюкоза; NeuNAc — N-ацетилнейраминная кислота (сиаловая кислота); GlcNAc — N-ацетилглюкозамин



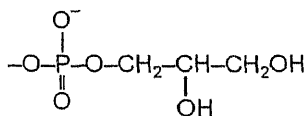
Фосфатидилэтаноламин



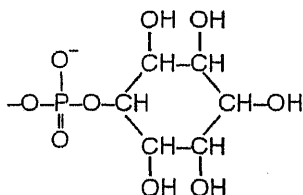
Фосфатидилхолин



Фосфатидилсерин



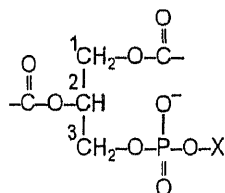
Фосфатидилглицерин



Фосфатидилинозитол

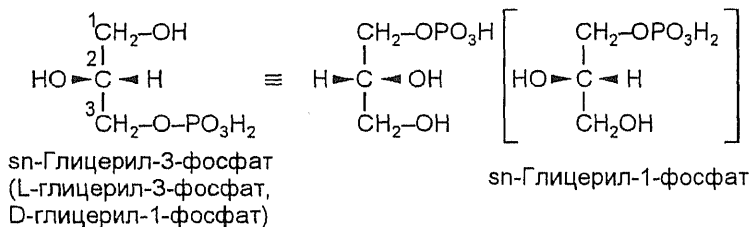
Рис. 2. Структура полярных головок наиболее распространенных глицерофосфолипидов

Фосфолипиды подразделяют на глицерофосфолипиды и сфингофосфолипиды (рис. 1, 2). В глицерофосфолипидах две первичные гидроксильные группы глицерина этерифицированы жирными кислотами, а третья OH-группа образует сложную эфирную связь с фосфорной кислотой:



В положении 2 остатка глицерина находится ненасыщенная жирная кислота. X — спиртовая группа — азотистое (холин, этаноламин) или безазотистое (инозит, глицерин) основание, этерифицированное фосфорной кислотой. Номенклатура глицерофосфолипидов основана на системе стереоспецифической нумерации (sn-система) и связана с наличием асимметрического атома угле-

рода (хирального центра) в глицериновом остатке, что приводит к появлению L- и D-стереоизомеров:



Углеродный атом на вершине проекции Фишера обозначается С-1, если углеводородная цепь или ОН-группа, присоединенная к С-2, направлены влево. У большинства глицерофосфолипидов фосфатная группа находится в sn -3-положении глицерина. Производные глицерофосфолипидов, утратившие в результате гидролиза одну из двух ацильных групп, получили название лизоформ или лизофосфолипидов. Глицерофосфолипиды широко представлены в мембранах эу- и прокариотических клеток, за исключением архебактерий. Фосфатидилхолин — основной компонент мембран животных клеток, фосфатидилэтаноламин часто входит в состав бактериальных мембран. К глицерофосфолипидам относятся также кардиолипиды — димерные формы фосфолипидов. В большом количестве они содержатся во внутренней мембране митохондрий, в мембране хлоропластов и некоторых бактериальных мембранах. Глицерофосфолипиды, у которых одна из углеводородных цепей представляет собой виниловый эфир, называются плазмалогенами. Этаноламиновые плазмалогены содержатся в миелине и саркоплазматическом ретикулуме сердца.

Сфингофосфолипиды построены на основе длинноцепочечного ненасыщенного аминспирта сфингозина. Наиболее распространенный сфингофосфолипид плазматических мембран животных клеток (особенно клеток мозга) — сфингомиелин. В мембранах растительных и бактериальных клеток сфингофосфолипиды встречаются редко.

Гликолипиды содержат моно- или олигосахаридный остаток, соединенный с липидной частью гликозидной связью без участия фосфата. Они локализованы, как правило, на наружной поверхности плазматической мембраны и определяют ее антигенные, рецепторные и, возможно, механические свойства. Глико-

липиды делятся на цереброзиды и ганглиозиды. Головку молекулы цереброзидов образует полярная гидрофильная углеводная группа, чаще всего галактоза, а неполярная часть представлена остатками сфингозина и этерифицированной жирной кислотой. Это нейтральные липиды, в значительных количествах содержащиеся в миелиновых оболочках нервных стволов. Сульфозэфиры цереброзидов, образованные при участии ОН-группы углеводного компонента, называют сульфocereброзидами или сульфатидами. Ганглиозиды представляют собой сиалоглико-сфинголипиды, которые включают в свой состав один или несколько остатков сиаловой кислоты (N-ацетилнейраминовой кислоты). Они содержатся преимущественно в мембранах нервных клеток и являются кислыми липидами.

Глико-сфинголипиды мембран эритроцитов несут антигены групп крови. В клетках аденокарциномы накапливаются фукозиллированные глико-сфинголипиды, которые можно использовать для обнаружения этих клеток и контроля за развитием опухоли.

Стероиды присутствуют во многих мембранах растений, животных, микроорганизмов. Широко распространен среди них холестерин. Его молекула состоит из четырех колец (гидрофобное ядро), одно из которых соединено с гидроксильной группой, выполняющей роль полярной головки, а пятичленное кольцо связано с разветвленной углеводородной цепочкой из восьми атомов углерода. Холестерин содержится в плазматических мембранах животных клеток (составляет около 30 % массы мембранных липидов), лизосомах, аппарате Гольджи. Нарушение содержания холестерина в тканях может приводить к развитию ряда патологических состояний человека (желчнокаменной болезни, атеросклероза). В высших растениях обнаружены другие стероиды, чаще всего ситостерин и стигмастерин.

Как правило, при нейтральных значениях рН молекулы липидов электронейтральны или заряжены отрицательно. Поэтому удобно классифицировать липиды по заряду полярной группы, что особенно важно для изучения функционирования биомембран, так как зарядовое состояние поверхностных участков мембраны влияет на активность мембранных белков-ферментов. В связи с этим выделяют: нейтральные липиды, полярные головки которых не несут заряда (триглицериды, холестерин, цереброзиды); цвиттерийонные липиды, в полярных головках которых положительный и отрицательный заряды нейтрализуют друг

друга (сфингомиелин, фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин); кислые липиды с отрицательно заряженными головками (фосфатидилсерин, фосфатидилглицерин, фосфатидилинозитол, кардиолипин, ганглиозиды).

Жирные кислоты, входящие в состав мембранных липидов, представлены насыщенными — стеариновой (18:0), пальмитиновой (16:0), миристиновой (14:0) и ненасыщенными — олеиновой (18:1), линолевой (18:2), линоленовой (18:3), арахидоновой (20:4) — жирными кислотами. Почти все природные жирные кислоты характеризуются цис-конфигурацией двойных связей. Углеводородная цепь в такой конфигурации имеет излом, что нарушает упаковку липидных молекул в бислой. Огромное разнообразие фосфолипидов и различия в их физико-химических свойствах обусловлены возможностью комбинирования полярных головок с различными кислотами. Лизоформы липидов, имеющие одну углеводородную цепь, при высоких концентрациях действуют подобно детергентам и способны разрушать клеточные мембраны. Примером является лизолецитин (1- или 2-ацилглицерофосфохолин), образующийся из фосфатидилхолина (лецитина) под действием фосфолипаз A_1 и A_2 . В его присутствии происходит распад клеточных мембран, что может служить одной из причин смерти при укусе змей. В молекулах одноцепочечных диольных липидов вместо глицерина содержатся более простые спирты — этиленгликоль или пропандиол. Предполагают, что они способны выполнять регуляторную роль в функционировании биомембран. Синтез этих липидов резко усиливается в случае возрастания функциональной активности клеток (например, в созревающих семенах и клетках регенерирующих тканей).

Общее содержание липидов в биомембранах варьирует от нескольких процентов у прокариот (например, 6—9 % у *Bacillus megaterium*) до 60—80 % в мембранах миелина эукариот. В среднем липиды составляют 15—50 % от сухой массы мембраны (табл. 1). Причем среди них преобладают амфифильные фосфолипиды. Одним из основных структурообразующих липидов на всех уровнях биологической организации является фосфатидилэтаноламин.

В состав липидов бактерий в значительных количествах входят фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерин, кардиолипин, а в меньших — фосфатидная кислота, фосфатидилинозитол, фосфатидилсерин, фосфатидилхолин. К специфическим “бактериальным” липидам относят аминоксилфосфолипиды у грампо-

Т а б л и ц а 1

Содержание липидов в различных мембранах

Вид мембраны	Общие липиды, % от сухой массы	Фосфолипиды, % от сухой массы	Стероиды, % от общих липидов
Плазматическая:			
печени крысы	50,0	67,5	13
скелетной мышцы кролика	15,8	48,5	32,5
аксона мозга быка	13,5	52,2	20,1
синапсом мозга крысы	50	71	16
эритроцита кролика	40	65,8	28,9
амебы <i>A. castellani</i>	42	59	29
бактерии <i>E. coli</i>	45,3	96	—
Внутренняя мембрана митохондрий печени крысы	17	87	1,5
Саркоплазматический ретикулум скелетной мышцы кролика	25	90	10
Фоторецепторная мембрана сетчатки кальмара	25	74	17

ложительных бактерий, липид А липополисахарида — у грамотрицательных и “гибридные” фосфогликолипиды — у микоплазм и молочнокислых бактерий.

Особенностью липидного состава эукариотических клеток является наличие фосфатидилхолина и стероидов. Фосфатидилхолин обладает исключительной способностью существовать в виде бимолекулярных слоев в широком диапазоне ионных концентраций и температур. Кроме того, он формирует стабильные ламеллярные структуры при смешивании с другими липидами, которые не могут образовывать бислои при данных условиях. В мембранах эукариот суммарное содержание цвиттерионных липидов (фосфатидилхолин + фосфатидилэтаноламин + сфингомиелин) составляет 75—90 % от общего количества фосфолипидов (табл. 2).

Мембраны вирусов содержат практически те же классы липидов, что и мембраны клетки-хозяина, однако их соотношение может быть другим. В состав вирусных фосфолипидов входит значительно больше насыщенных жирнокислотных остатков, чем

Таблица 2

Липидный состав мембран высших животных

Тип мембраны	Содержание фосфолипидов, мол. % от суммы							Содержание ХС, моль/моль ФЛ
	ФХ	ФЭ	СМ	ФС	КЛ	ФИ	лизо- формы	
Плазматическая	39	23	16	9	1	8	2,3	0,37
Митохондриальная	40	34	—	1	17	7	1	0,03
Ядерная	44	3	16	4	1	6	1	—
Аппарат Гольджи	50	20	8	6	1	12	3	0,21
Саркоплазматический ретикулум	68	15	8	3	2	—	3	0,21

Обозначения: ФЛ — фосфолипиды, ФХ — фосфатидилхолин, ФЭ — фосфатидилэтанолламин, СМ — сфингомиелин, ФС — фосфатидилсерин, КЛ — кардиолипин, ФИ — фосфатидилинозитол, ХС — холестерин.

в состав липидов клеток хозяина, в основном, за счет высокого содержания сфингомиелина. Кроме того, молярное отношение холестерина/фосфолипид в вирусных мембранах обычно близко к единице, а в клетках хозяина составляет 0,2—0,4. Эти особенности липидного состава вирусов обеспечивают плотную упаковку липидных молекул и способствуют более эффективной защите вирусных частиц.

Липидный состав клеточных мембран, скорость обмена мембранных липидов существенно изменяются в ходе развития и трансформации клеток. Изменения в функционировании мембран, происходящие на разных этапах развития клеток, обуславливают изменения в относительном содержании липидов, вязкости углеводородной части бислоя. Так, например, в растущих и делящихся клетках содержится больше ненасыщенных жирных кислот и липидов в целом. При созревании эритроцитов по мере уменьшения функциональной активности их мембран происходит возрастание микровязкости последних. Увеличение вязкости углеводородной части мембран может происходить за счет повышения содержания холестерина. Акклиматизация различных организмов к холоду неизменно связана с увеличением степени ненасыщенности жирнокислотных остатков фосфолипидов, что находит отражение в повышении содержания полиненасыщенных жирных кислот. Фосфолипидный состав мембран изменяется также в зависимости от сезона и режима питания живых организмов.

1.1.2. Физико-химические и динамические свойства и функции липидов мембран

В водной среде мембранные липиды ведут себя как анизотропные жидкости, обладающие свойствами жидких кристаллов. В жидком кристалле сочетаются особенности кристалла (дальний порядок организации, двулучепреломление) и жидкости (образование капель и текучесть). Всем жидким кристаллам свойствен полиморфизм, т. е. они могут существовать в нескольких жидkokристаллических фазах. Даже индивидуальные очищенные липиды в гидратированном состоянии могут находиться в нескольких структурных модификациях. Преобладание того или иного типа структуры определяется целым рядом факторов: концентрацией липида, температурой, величиной pH, ионной силой, давлением. Формирование мезоморфных структур фосфолипидов мембран зависит от соотношения липид/вода (*лиотропный мезоморфизм*) и от температуры (*термoтpонный мезоморфизм*).

Сочетание в молекуле липида полярного и неполярного компонентов, т. е. дифильность, обуславливает ее амфипатические свойства и, следовательно, способность к образованию мембран. Наиболее энергетически выгодным положением для молекул липидов является формирование мономолекулярного слоя на поверхности раздела масло — вода или вода — воздух (рис. 3). При достижении определенной концентрации липида — критической концентрации мицеллообразования (ККМ) его молекулы объединяются в замкнутые агрегаты — мицеллы, в которых полярные головки обращены к воде, а гидрофобные хвосты направлены внутрь. Для большинства липидов ККМ составляет менее 1 %. При более высокой концентрации формируется бимолекулярный липидный слой (ламеллярная структура). Для ламеллярной жидkokристаллической фазы (L_α) характерно упорядоченное расположение слоистых структур при значительной неупорядоченности ацильных цепей. Считают, что именно в этой фазе находится основная масса липидов биомембран. Ламеллярная гелевая фаза (L_β) образуется при низкой температуре теми липидами, которые формируют слоистые структуры. В этой фазе молекулы упаковки более плотно (на молекулу приходится меньшая площадь поверхности), а углеводородные цепи более упорядочены и находятся преимущественно в транс-конфигурации. Так как цепи максимально вытянуты, толщина бислоя в фазе геля выше, чем в жидkokристаллической фазе. В случае образования гексагональ-

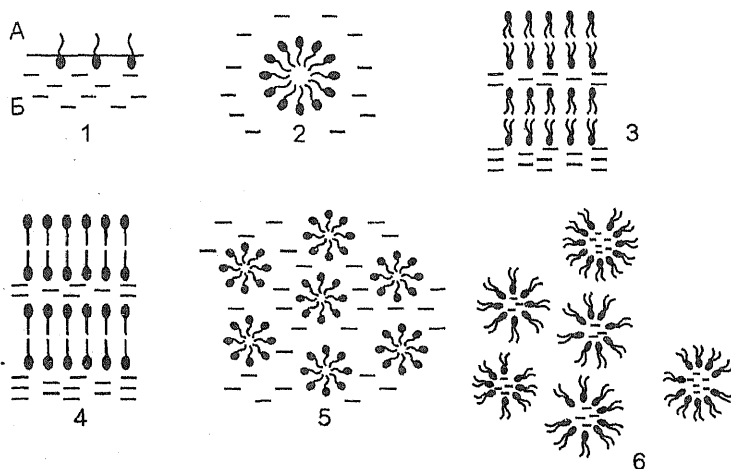


Рис. 3. Типы структурной организации водно-липидных систем: А — воздух; Б — вода; 1 — монослой липидов; 2 — мицеллы фосфолипидов в воде; 3 — ламеллярная жидкокристаллическая фаза L_α ; 4 — ламеллярная гелевая фаза L_β ; 5 — гексагональная фаза типа H_I ; 6 — гексагональная фаза типа H_{II}

ной фазы H_I (H_I) липидные молекулы формируют цилиндрические структуры, поверхность которых образована полярными головками и контактирует с водой. Цилиндры упаковываются с образованием гексагональной решетки. Липиды в гексагональной фазе H_{II} (H_{II}) также образуют цилиндры, но полярные группы обращены внутрь цилиндра и формируют водный канал. Следует отметить, что некоторые липиды (ненасыщенные фосфатидилэтаноламины, моногалактозилдиацилглицерол) не образуют стабильные бислои, а находятся в гексагональной фазе H_{II} . Для изучения типов структурной организации водно-липидных систем используют метод дифракции рентгеновских лучей, а также дифференциальную сканирующую калориметрию, электронную микроскопию и метод ЯМР.

Термотропный мезоморфизм — это зависимость состояния липидных молекул от температуры. В твердой или гелеобразной фазе углеводородные цепи ориентированы строго параллельными зигзагами. После фазового перехода в жидкокристаллическое состояние, который определяется температурой и аналогичен процессу плавления, углеводородные цепи становятся подвижными. “Жидкое” состояние мембранных липидов необходи-

мо для нормального функционирования всех биомембран, причем степень вязкости зависит от функциональных особенностей мембраны. В среднем вязкость нормальной мембраны соответствует примерно вязкости оливкового масла. Термотропный мезоморфизм существенно зависит от природы жирных кислот и полярной головки липидов. Так, увеличение числа двойных связей и укорочение углеводородных цепей приводят к снижению температуры фазового перехода.

Вышеописанные свойства липидов взаимосвязаны друг с другом. Температура фазового перехода зависит от содержания воды в анализируемой системе.

Различные липиды способны к формированию разных мезоморфных структур, что обусловлено особенностями строения молекул и соотношения объемов полярных головок и углеводородных хвостов. Липиды с электронейтральной головкой (фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, сфингомиелин) образуют ламеллярную фазу. Липиды с отрицательно заряженными головками вследствие действия электростатических сил отталкивания формируют мицеллярные или гексагональные структуры. В случае равенства объемов, занимаемых полярными головками и углеводородными хвостами, молекулы липида имеют цилиндрическую форму и образуют бислой (фосфатидилхолин). Если объем полярной головки больше объема углеводородных цепей (лизосомальные фосфолипиды), то молекула имеет форму перевернутого конуса и в водном растворе находится в мицеллярной фазе. Если объем полярной головки меньше объема углеводородных цепей (ненасыщенный фосфатидилэтаноламин, кардиолипин в присутствии ионов Ca^{2+} , фосфатидная кислота), то молекула липида имеет форму конуса и образует гексагональную фазу типа II. В целом способы упаковки различных липидов с учетом геометрической формы их молекулы определяются следующими параметрами: молекулярным объемом неполярной части молекулы V , максимальной длиной этого участка l , оптимальной площадью поверхности, занимаемой полярной головкой S_0 . Критический параметр упаковки липидов представляет собой величину V/lS_0 .

Фазовые переходы липидов сопровождаются значительным повышением ионной проницаемости мембран. По-видимому, мицеллярная и гексагональная фазы, способные формировать сквозные поры, более проницаемы для ионов и воды, чем бислойная ламеллярная структура. Способность мембранных фосфолипидов

к образованию в водной среде мезоморфных структур в физиологическом оптимуме температур обуславливает ион-регуляторную функцию мембранных липидов. Так, для заряженных фосфолипидов, фосфатидилэтаноламина и лизолецитина возможны фазовые переходы из бислоя в мицеллярную и гексагональную фазы. Для фосфатидилхолина характерен вид бислойной ламеллы с фазовыми переходами термотропного характера из жидкокристаллического состояния в гель и обратно. В связи с этим выяснение молекулярных механизмов полиморфных переходов в липидной фазе необходимо для изучения процессов транспорта веществ через биомембраны.

Динамическое состояние липидного бислоя, являющееся основой функционирования мембраны, определяется целым рядом факторов: вращательной и латеральной диффузией отдельных молекул фосфолипидов, подвижностью их углеводородных цепей, транс-гош-изомеризацией остатков жирных кислот. Лабильность мембранных белков, в свою очередь, зависит от фазового состояния и вязкости липидного матрикса мембраны. С помощью метода ЭПР показано, что для молекул фосфолипидов в мембранах характерны движения двух типов:

1) латеральная диффузия — перемещение в пределах одного слоя липидной фазы параллельно поверхности мембраны;

2) трансбислойный переход типа “флип-флоп” — перемещение из одного монослоя липидного матрикса в другой. Его частота в везикулах яичного лецитина около $2 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$, он происходит на 12 порядков медленнее, чем латеральная диффузия. “Флип-флоп”-переходы молекул фосфолипидов характеризуются высокими значениями энергии активации ($\approx 80 \text{ кДж/моль}$), а обмен в пределах одного монослоя липидов — более низкими ($\approx 21 \text{ кДж/моль}$).

Движение углеводородных цепей состоит из торсионных (вращательных, крутильных) колебаний с относительно малой амплитудой ($< 20^\circ$) вокруг каждой из связей (время корреляции вращения $\approx 10^{-14} \text{ с}$) и транс-гош-изомеризации отдельных звеньев ($\approx 10^{-10} \text{ с}$). Минимальной энергией обладает транс-, а максимальной — цис-конформация углеводородных цепей. Углеводородные цепи в полной транс-конформации представляют собой линейные структуры. Гош-конформации (гош “+” и гош “-”; поворот на $\pm 120^\circ$ относительно транс-конформации) мало превышают по уровню энергии транс-конформацию (на 2—3 кДж/моль),

но эти состояния разделяет энергетический барьер высотой примерно 12—17 кДж. Появление одиночной гош-конформации приводит к искривлению пространственной конформации углеводородной цепи примерно на 120° , что затрудняет появление одиночных гош-конформаций. При последовательном повороте цепи на $+120$ и -120° , т. е. при образовании двух гош-конформаций (“+” и “-”) пространственная структура цепи сохраняется прямолинейной. Участок цепи, находящийся в гош “+”- транс-гош “-”-конформации, формирует в углеводородной цепи петлю, называемую *кинком*. Образование кинка сопровождается уменьшением эффективной длины углеводородной цепи примерно на 0,127 нм, а объем, занимаемый молекулой липида, увеличивается (рис. 4). Формирование кинков — кооперативный процесс, приводящий к возрастанию разупорядоченности углеводородной зоны и ее плавлению. Этот процесс стимулируют двойные (цис-) связи в ненасыщенных цепях мембран. Для образования кинка в таких участках необходимо появление лишь одной гош-конформации при искривлении цепи на 80° . Поэтому высокая текучесть углеводородной зоны мембран в жидкокристаллическом состоянии объясняется возрастанием амплитуды крутильных осцилляций вокруг С—С-связей, появлением гош-конформаций.

С текучестью мембран тесно связаны функциональная активность мембраносвязанных ферментов, а также функционирование систем пассивного транспорта. Формирование кинков, обусловленное появлением в липидном бислое флуктуирующих объемов, является одним из возможных механизмов трансмембран-

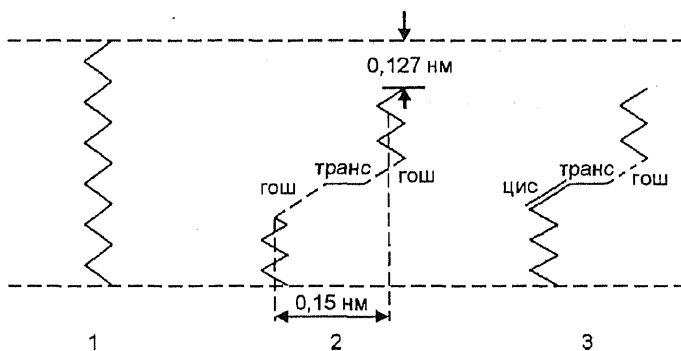


Рис. 4. Конформация углеводородных цепей липидов в мембране: 1 — полная транс-конформация; 2 — гош-транс-гош-конформация; 3 — цис-транс-гош-конформация

ного переноса воды и ионов. Вопросы, касающиеся выяснения роли мембранных липидов в процессах транспорта ионов и механизмов образования ионных каналов при фазовых превращениях липидов, подробно изложены в монографии В. Ф. Антонова “Липиды и ионная проницаемость мембран” (1982).

Динамическая модель липидного бислоя показана на рис. 5. Липидный матрикс состоит из области полярных групп Р и области углеводородных цепей Н. Углеводородная часть представлена как бы тремя слоями: двумя упорядоченными толщиной $\sim 0,8$ нм, прилегающими к полярной области, и центральным “изотропным”, подобным короткоцепочечному жидкому углеводороду. Толщина этого центрального слоя для бислоев дипальмитоил-, димиристоил- и дилауроиллецитина составляет соответственно 0,85 и 0,2 нм. По-видимому, существование “изотропной” области необходимо для того, чтобы бислоем был непроницаем для ионов и малых молекул. Повышение проницаемости липидного матрикса связано с образованием кластеров и динамических дефектов. Кластеры — это области с сохраняющимся ближним порядком молекул, упаковка которых близка к кристаллической. Кластеры представляют собой динамические (мгновенные) образования с временем жизни $\sim 10^{-7}$ с, включающие 40—60 углеводородных цепей (20—30 молекул фосфолипидов). В них ближайшие к полярным головкам участки углеводородных цепей имеют несколько более плотную упаковку, чем в “твердом” бислое. По направлению к центру бислоя плотность упаковки уменьшается, как и на границах кластеров, кото-

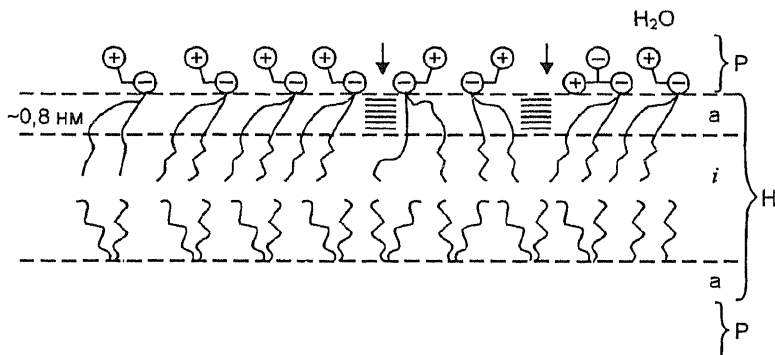


Рис. 5. Динамическая организация липидного бислоя: Р — области полярных групп; Н — области углеводородных цепей; а — упорядоченная “анизотропная” область; i — “изотропная” область; ↓ — динамические дефекты

рые непрерывно распадаются и образуются, перемещаясь вдоль бислоя. При этом граничные области между кластерами представляют собой динамические дефекты в бислое. Последние также носят динамический характер, поэтому степень проницаемости липидной мембраны должна зависеть от времени жизни дефектов. Увеличение времени их жизни путем фиксации части кластеров при отвердевании бислоя приводит к резкому (на 1—2 порядка) возрастанию проницаемости мембраны.

Необходимо отметить, что на ориентацию и динамику полярных головок липидов влияет образование межмолекулярных водородных связей на поверхности мембраны. Донорами и акцепторами при образовании этих связей могут служить фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, гликолипиды. Однако не ясно, каким образом водородные связи воздействуют на структуру мембраны. С точки зрения термодинамики, основной силой, стабилизирующей гидратированные липидные агрегаты, являются гидрофобные взаимодействия. К другим стабилизирующим факторам относятся водородные связи и ван-дер-ваальсовы силы (короткодействующие слабые силы притяжения между соседними гидрофобными цепями).

Важнейшим свойством липидного бислоя мембран является *структурная асимметрия* — различное распределение липидов между внутренним и наружным монослоями. Анализ распределения фосфолипидов в мембранах микросом, аппарата Гольджи, лизосом, ядер, митохондрий показывает, что фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин расположены преимущественно на цитоплазматической стороне, сфингомиелин, кардиолипин и фосфатидилинозитол — на внутренней, топологичной наружной стороне плазматических мембран, а фосфатидилхолин более или менее равномерно распределен между обеими сторонами. В наружном монослое липидов мембран эритроцитов человека содержится 44 % фосфатидилхолина, 44 % сфингомиелина и 12 % фосфатидилэтанолamina, во внутреннем — 48 % фосфатидилэтанолamina, 28 % фосфатидилсерина, 10 % сфингомиелина и 14 % фосфатидилхолина.

Углеводородные цепи, входящие в состав фосфатидилхолина и сфингомиелина, более насыщены по сравнению с теми, которые находятся в составе фосфатидилэтанолamina и фосфатидилсерина. В связи с этим асимметрия в распределении полярных головок сопровождается асимметрией распределения жирнокислот-

ных хвостов. Это может привести к тому, что текучесть внутреннего монослоя будет несколько больше, чем внешнего. Известно также, что отрицательно заряженный фосфатидилсерин локализован во внутреннем монослое, следовательно, две стороны бислоя существенно различаются и по заряду. Феномен асимметричного распределения липидов необходим для проявления функциональной активности многих мембраносвязанных ферментов. Так, при активации протеинкиназы С она связывается с цитоплазматической стороной плазматической мембраны, где концентрируется фосфатидилсерин, необходимый для работы фермента. Асимметрия распределения липидов определяется не только липид-белковым взаимодействием, но и асимметрией липидного синтеза, различиями ионного состава вне- и внутриклеточной среды. Асимметрия бислоя обеспечивается ферментами липидного обмена и липидпереносящими белками (липазами, системами обмена холестерина, метилазами фосфатидилэтаноламина).

Липиды в биомембранах выполняют множество функций. Во-первых, они обеспечивают структурную организацию и стабильность клеточных мембран. Во-вторых, выполняют барьерную и транспортную функции. В-третьих, играют фундаментальную роль в передаче информации и регулировании метаболических процессов в клетке. Последняя функция мембранных липидов включает участие их в реакциях биосинтеза; поддержании оптимальной активности белков-ферментов мембран; выполнении рецепторных функций, обеспечивающих проявление иммунологических свойств и ответственных за взаимодействие клеток; а также в процессах накопления, передачи и хранения энергии. Липиды участвуют в механизмах кратковременной и долговременной памяти. В дальнейшем вопрос о выполнении липидами регуляторной роли в различных процессах метаболизма будет рассмотрен более подробно в главах 2, 3.

1.2. МЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ

1.2.1. Классификация, структура и функции мембранных белков

Белки обеспечивают выполнение мембранами их специфических функций. Поэтому содержание и типы белков в различных мембранах значительно варьируют. Так, в миелиновой мембране, выполняющей функцию изолятора, белки составляют около 20 % массы мембраны. Цитоплазматическая мембрана животных

клеток на 50 % состоит из белка, во внутренней мембране митохондрий на его долю приходится около 75 % (табл. 3). Плотность мембран прямо пропорциональна содержанию в них белка.

Обычно мембранные белки подразделяют на наружные (периферические) и внутренние (интегральные). При этом критерием служит степень жесткости обработки, необходимой для извлечения этих белков из мембраны. *Периферические белки* высвобождаются при промывании мембран буферными растворами с низкой ионной силой, с низким или высоким значением pH, в присутствии растворов хелатирующих агентов (ЭДТА), связывающих двухвалентные катионы. Такие белки контактируют с поверхностью мембраны в основном за счет слабых электростатических взаимодействий с полярными головками липидных молекул либо с молекулами других белков. В определенных условиях с биомембранами могут взаимодействовать некоторые водорастворимые цитоплазматические белки. Поэтому возникла необходимость в дополнительной классификации периферических белков, которые делятся на две группы: собственно периферические и поверхностные. Собственно периферические белки, как правило, связаны с мембраной электростатическими силами и могут быть частично погружены в ее гидрофобную область. Поверхностные белки прикрепляются к мембране только за счет электростатических взаимодействий. К периферическим белкам относят гексокиназу, связанную с белком порином, локализованным во внешней мембране митохондрий; цитохром С, который образует комплекс с мембранным белком цитохромоксидазой; креатинфосфокиназу, взаимодействующую с кардиолипином внутренней мембраны митохондрий. В группу периферических включают и белки цитоскелета: актин и миозин, ассоциированные с внутренней поверхностью мембраны в клетках эукариот, а также спектрин эритроцитов. У эукариот к числу периферических белков относят коллаген, фибронектин, ламинин, расположенные на внешней поверхности мембраны, входящие в состав экстраклеточного матрикса. Это гликопротеины, выполняющие сигнальную и структурные функции.

По функциям периферические белки делятся на следующие группы:

- 1) регуляторно-сигнальные (белки экстраклеточного матрикса);
- 2) структурно-каркасные (актин-спектриновые комплексы);
- 3) белки, обеспечивающие подвижность клеток и субклеточных структур (белки микротрубочек и микрофиламентов).

Таблица 3

*Белковый и липидный состав некоторых мембран животных
и бактериальных клеток*

Мембраны	Основные белки	Основные липиды	Отношение липид/белок по массе су- хого вещества)
Миелин человек	Основной белок липофин протеолипид	ФХ — 10 %, ФЭ — 20 %, ФС — 8,5 %, СМ — 8,5 %, ганглиозиды — 26 %, холестерин — 27 %	3—4
Мембраны дисков бык	Родопсин	ФХ — 41 %, ФЭ — 39 %, ФС — 13 %, следы холестерина	1
Эритроциты человек	Белок полосы 3, гликофорин, спектрин, глицеральде- гид-3-фосфат- дегидрогеназа	ФХ — 25 %, ФЭ — 22 %, ФС — 10 %, СМ — 17 %, холестерин — 25 %	0,75
Мембраны холинэргиче- ского рецеп- тора Torpedo marmorata	Ацетилхолино- вый рецептор	ФХ — 24 %, ФЭ — 23 %, ФС — 9,6 %, холестерин — 40 %	0,5—0,7
Саркоплазма- тический ретикулум кролик	Ca ²⁺ -АТФаза	ФХ — 66 %, ФЭ — 12,6 %, ФИ — 8,1 %, холестерин — 10 %	0,66—0,70
Пурпурная мембрана Halobacterium halobium	Бактериородоп- син	Фосфатидилглицерол- фосфат — 52 %, гликолипиды — 30 %, нейтральные липи- ды — 6 %	0,2

Для высвобождения из мембраны интегральных белков необходимо использовать детергенты или органические растворители. Детергенты разрушают липидный бислой и связываются с неполярными участками мембранных белков, контактирующими с гидрофобной областью бислоя. *Интегральные белки* представляют собой глобулярные амфифильные макромолекулы, взаимодействующие и с гидрофобными, и с гидрофильными компо-

нентами мембраны. Особенностью их структуры является высокое содержание α -спиральных участков и участков с конформацией статистического клубка. Степень погружения интегральных белков в липидный матрикс определяется их аминокислотным составом (количеством аминокислотных остатков с неполярными боковыми радикалами) и трехмерной пространственной структурой. Эти белки выполняют в мембране транспортную, рецепторную и ферментативную функции. К ним относят гликофорины, АТФазы, цитохром b_5 , родопсин, бактериородопсин и др. Следует отметить, что с высоким разрешением установлена структура только бактериородопсина, однако и в этом случае положение белка относительно липидного бислоя не определено однозначно. Детальное исследование интегрального мембранного белка должно включать экспериментальное изучение его топографии. Для этого используют целый арсенал методов: протеолиз, иммунологические методы (применение моноклональных и поликлональных антител против пептидов, соответствующих определенным областям белка), химическую модификацию (например, солями диазония), генетические подходы.

Различия периферических и интегральных белков определяют степень связывания их с мембраной, но не способ их прикрепления к бислою. На рис. 6 показаны способы прикрепления белков к мембране:

1 — связывание с “якорными” белками, погруженными в бислой. Примеры: F_1 -часть H^+ -АТФазы связана с F_0 -частью, погруженной в мембрану; сукцинатдегидрогеназа, некоторые белки цитоскелета;

2 — связывание с поверхностью бислоя. Эти взаимодействия имеют либо электростатическую природу (a), например, миелиновый основной белок, либо гидрофобную, но практически без погружения в бислой (b), например, пируватоксидаса, фосфолипазы;

3 — связывание с помощью гидрофобного “якоря”. Цитохром b_5 имеет короткий концевой сегмент из неполярных аминокислотных остатков (a). Некоторые белки используют в качестве “якоря” ковалентно связанные с ними жирные кислоты или фосфолипиды, например, щелочная фосфатаза эукариот (b);

4 — пересечение мембраны трансмембранными белками. Гликофорин имеет одиночный трансмембранный сегмент (a), а лактопермеаза и бактериородопсин — несколько (b).

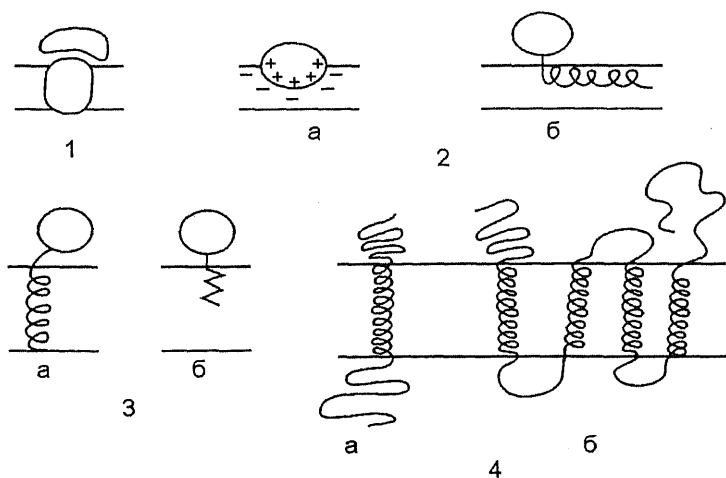


Рис. 6. Способы прикрепления белков к мембране. Объяснения в тексте

Мембранные белки эукариот могут быть ковалентно связаны с липидами. Их подразделяют на три группы:

- белки, связанные с миристиновой кислотой (14:0): каталитическая субъединица сАМР-зависимой протеинкиназы, NADPH-цитохром b_5 -редуктаза;

- белки, связанные с пальмитиновой кислотой (16:0): родопсин, анкирин;

- белки, связанные с гликозилфосфатидилинозитолом: ацетилхолинэстераза, 5'-нуклеотидаза, щелочная фосфатаза.

Белки, связанные с жирными кислотами, по-видимому, локализованы в основном на цитоплазматической поверхности плазматической мембраны, а белки, взаимодействующие с фосфатидилинозитолом, — на наружной. Миристиновая кислота присоединяется к белку через амидную связь с N-концевым глицином, пальмитиновая — путем образования тиоэфирной связи с цистеином или гидроксиэфирной связи с серином и треонином. Эти аминокислотные остатки расположены внутри основной части полипептида вблизи трансмембранных участков, как правило, на цитоплазматической стороне. Связь белков с производными фосфатидилинозитола локализована на С-концевом участке аминокислоты. Липиды присоединяются к белку либо посттрансляционно, либо одновременно с трансляцией на рибосомах (котрансляционно).

Поверхностные белки клеток млекопитающих, а также большинство рецепторов и транспортных белков почти всегда гликози-

лированы. Олигосахаридные остатки могут защищать белки от протеолиза или участвовать в узнавании и адгезии. Выделяют две группы олигосахаридных структур мембранных гликопротеинов:

— N-гликозидные олигосахариды, связанные с белками через амидную группу аспарагина;

— O-гликозидные олигосахариды, связанные через гидроксильные группы серина или треонина.

Гликофорин А мембраны эритроцитов гликозилирован путем присоединения одного N-гликозидного олигосахариды и 15 серин/треонин-связанных олигосахаридов.

Наиболее детально исследован белковый состав эритроцитов млекопитающих (табл. 4).

Классической работой по электрофоретическому разделению белков мембран эритроцитов человека является исследование Фейрбанкса и соавт. (1971), в котором предложена номенклатура полипептидных полос, выявляемых в солюбилизированной с помощью додецилсульфата натрия (ДСН) мембране. Этой номенклатурой пользуется в настоящее время большинство ученых. Наличие сетчатой структуры, выстилающей внутреннюю поверхность мембраны эритроцита, было обнаружено непосредственно с помощью электронной микроскопии после обработки клеток неионным детергентом тритоном X-100. При определенных экспериментальных условиях (в среде с высокой ионной силой и при низкой температуре) применение этого детергента позволяет полностью солюбилизовать липидный бислой и интегральные белки. При этом остается сеть белков, сохраняющая исходную форму клетки, которая представляет собой *мембранный скелет (каркас)* эритроцита. Он тестируется в виде двухмерной сети филаментов, длина которых зависит от особенностей приготовления препарата для микроскопии. Необходимо отметить, что белки, близкородственные компонентам цитоскелета эритроцитов, обнаружены в ряде незритроидных клеток. В связи с универсальностью данной системы следует более подробно рассмотреть структуру и свойства некоторых цитоскелетных белков.

1.2.2. Цитоскелет (мембранный каркас)

Основными компонентами мембранного скелета эритроцита являются спектрин, актин, анкирин, а также белки полосы 4.1 и 4.9. Мембранный скелет содержит около 50 % всех белков, присутствующих в мембране.

Таблица 4

Свойства, степень ассоциации и функции некоторых эритроцитарных мембранных белков

Пептидная фракция	Молекулярная масса субъединицы	Число молекул на клетку, $\times 10^{-5}$	Степень ассоциации	Функция	Связь с белками
Полоса 1 (спектрин) Полоса 2 (спектрин)	240000—260000 (α) 220000 (β)	2,2	Димеры полос 1 и 2 образуют тетрамеры и олигомеры	Участвует в формировании мембранного скелета	Полоса 3 (с полосой 1), анкирин (с полосой 2), полоса 4.1
Полоса 2.1 (анкирин)	215000—165000	1,1	Мономер	Связывает спектрин с мембраной через белок полосы 3	Спектрин, полоса 3
Полоса 3	89000—95000	12	Тетрамер в равновесии с димерами	Транспорт неорганических анионов, взаимосвязь с мембранным скелетом	Анкирин, полосы 4.1 и 4.2, гликолитические ферменты
Полоса 4.1	78000—80000	2,3	Димер	Связывает мембранный скелет с интегральными белками; стабилизирует спектрин-актиновые взаимодействия	Спектрин, гликофорин
Полоса 4.5	52000—59000	0,7—1,4	?	Системы транспорта моносахаридов и нуклеозидов	?
Полоса 4.9	45000—48000	1	?	Связывание актина	Актин
Полоса 5 (актин)	43000	5,1	Олигомеры из 12—17 субъединиц	Участвует в формировании мембранного скелета	Спектрин, полоса 4.1
Полоса 6	35000	4,1	Тетрамер	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	Полоса 3
Гликофорин А Гликофорин В Гликофорин С	29000—31000 23000 25000—29000	2	Димер	Место прикрепления мембранного скелета	Полоса 4.1

Спектрин (рис.7), по данным электронной микроскопии, является гибкой молекулой в виде тяжа длиной 100 нм и представляет собой гетеродимер, составленный из двух полипептидных цепей α и β , уложенных антипараллельно. Однако в эритроцитах *in situ* основной формой спектрина является тетрамер, образованный путем самоассоциации гетеродимеров конец в конец. На обоих хвостовых концах тетрамера имеются центры связывания актина и белка полосы 4.1. Путем латеральной ассоциации тетрамер спектрина прикреплен к актину, присутствующему в интактной клетке в виде олигомеров из 12—17 субъединиц. Каждый такой протофиламент актина соединен в среднем с 6 тетрамерами спектрина, которые другим концом связаны с соседними протофиламентами актина. Предполагают, что белок полосы 4.1 облегчает ассоциацию спектрина с актином.

Спектрин имеет также центры связывания анкирина, находящиеся на β -субъединице и расположенные на расстоянии 20 нм от центра тетрамера. С помощью этого якорного белка актин-спектриновая сеть прикреплена к мембране через цитоплазматический участок белка полосы 3. По-видимому, это основной механизм прикрепления каркаса к мембране. Цепь белок полосы 3 — анкирин — спектрин представляет собой путь, связывающий наружную и внутреннюю поверхности мембраны эритроцита, позволяющий осуществлять контроль за протеканием внутриклеточных событий на уровне организма (см. главу 2). Установлено, что поддержание нормальной структуры мембранного каркаса эритроцита возможно при определенном оптимальном содержании АТФ и двухвалентных катионов (прежде всего Ca^{2+}) внутри клеток. По-видимому, степень фосфорилирования ком-

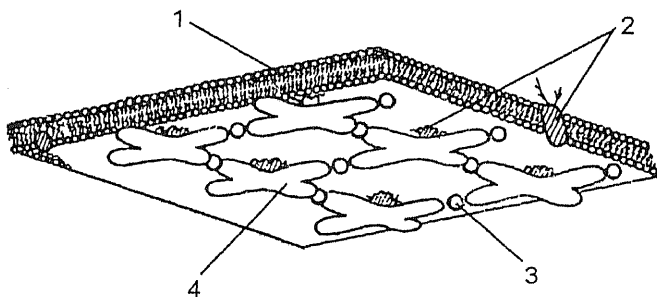


Рис. 7. Схема организации спектрин-актиновой сети: 1 — липидный бислой; 2 — интегральные белки; 3 — актин; 4 — тетрамер спектрина

понентов мембранного скелета определяет сродство Ca^{2+} к мембранным белкам. В свою очередь, ионы Ca^{2+} обуславливают прочность связи отдельных компонентов мембранного каркаса. В связи с этим регулирование свойств последнего, а, значит, и целой клетки, может осуществляться за счет изменения соотношения $[\text{АТР}]/[\text{Ca}^{2+}]$.

Мембранный скелет эритроцита — наиболее полно охарактеризованная разновидность цитоскелета эукариотической клетки. В прокариотических клетках наличие цитоскелета не выявлено. В целом цитоскелет эукариот представляет собой сложную сеть волокон, обеспечивающих механическую опору для плазматической мембраны, определяющих форму клетки, местоположение клеточных органелл и их перемещение при делении клетки. Цитоскелет образуют три типа волокон:

- 1) микрофиламенты (диаметр около 6 нм), состоящие из актина и связанных с ним белков;

- 2) промежуточные филаменты (диаметр 8—10 нм), состоящие из кератинов;

- 3) микротрубочки (диаметр 23 нм), состоящие из тубулина.

По-видимому, микрофиламенты участвуют в таких мембранных процессах, как рецепторзависимый эндоцитоз, пэтчинг и кэппинг антигенов на клеточной поверхности, цитокинез, клеточная подвижность. Микротрубочки образуют цитоплазматическую сеть, связывающую плазматическую мембрану с различными субклеточными компонентами.

Следует отметить, что одной из задач мембранологии является выявление молекулярных механизмов взаимодействия отдельных компонентов цитоскелета клетки и путей его регулирования, которые обеспечивают нормальное функционирование биосистем.

1.2.3. Интегральные белки биомембран

К настоящему времени накоплены сведения о структуре, внутримембранной организации, структурной динамике и механизмах функционирования некоторых ключевых интегральных белков, таких как гликофорин, цитохром b_5 , родопсин, бактериородопсин, аденилатциклаза, транспортные АТФазы и др. Охарактеризуем некоторые из них.

Гликофорин А является главным сиалогликопротеином плазматической мембраны эритроцита, определяющим ряд антигенов групп крови. Концевые участки его молекулы выступают по

обеим сторонам липидного бислоя. На наружной поверхности клетки гликофорин имеет центры, связывающие лектины и вирусы.

На долю белка полосы 3 приходится около 25 % общего количества мембранных белков эритроцитов человека. Этот белок имеет два высокоспециализированных домена. С-концевой домен встроен в липидный бислой мембраны и отвечает за перенос хлорид-, бикарбонат-, фосфат-анионов, поэтому белок полосы 3 называют анионным обменником. Его цитоплазматический N-концевой участок представляет собой полипептид с молекулярной массой 43 кДа, который может быть отщеплен от мембраны протеолитическими ферментами. Эта область белка полосы 3 способна связывать анкирин, белки полос 4.1 и 4.2, гемоглобин, некоторые гликолитические ферменты. К нему могут присоединяться и другие внутриклеточные белки и ферменты, например, аденилатциклаза.

Мембраносвязанные ферменты катализируют реакции, как правило, полностью протекающие по одну сторону биомембраны. Интегральные белки-ферменты присоединяют субстраты на одной стороне мембраны и выделяют продукты на противоположной стороне. Поэтому каталитическая реакция носит векторный (направленный) характер, а сами мембраносвязанные ферменты называют *векторными*. При этом ограниченная проницаемость мембран обеспечивает разделение компонентов реакции и образование концентрационных градиентов. К векторным ферментам биомембран относят аденилатциклазу (см. раздел 2.1.2), продуктом каталитической реакции которой является сАМР — универсальный регулятор важнейших метаболических процессов в клетке, а также транспортные АТФазы. В табл. 5 представлены сведения о классификации, виде транспортируемых ионов и локализации различных типов АТФаз.

1.2.4. Структура, функциональные и некоторые физико-химические свойства Na^+ , K^+ -АТФазы

В 1957 г. J. Skou* обнаружил в гомогенате периферических нервов краба АТФазу, активируемую ионами Na^+ и K^+ и ингибируемую специфическим блокатором активного транспорта одно-

* В 1997 г. ему была присуждена Нобелевская премия совместно с П. Войером, Д. Уолкером за изучение белков-ферментов, обеспечивающих преобразование химической и электрической энергии в клетке.

Таблица 5

Некоторые АТФазы, участвующие в транспорте ионов

Тип АТФаз и транспортируемые ионы	Источник	Мембрана
1. F_1F_2 -тип		
H^+	Низшие эукариоты дрожжи и грибы	Плазматическая
H^+	Высшие эукариоты Растения Животные	Плазматическая
K^+	Прокариоты <i>E. coli</i>	Цитоплазматическая
	Высшие эукариоты животные	Плазматическая
Na^+/K^+	<<	<<
Ca^{2+}	<<	<<
Ca^{2+}	<<	Саркоплазматическая
2. F_1F_0 -тип		
H^+	Большинство бактерий	Цитоплазматическая
H^+	Эукариоты животные и растения	Внутренняя митохондриальная
H^+	Растения	Тилакоиды хлоропластов
3. Вакуолярный тип		
H^+	Низшие эукариоты дрожжи и грибы	Вакуоли
H^+	Высшие эукариоты растения	Тонoplastы
H^+	Высшие эукариоты животные	Лизосомы
H^+	<<	Секреторные гранулы
H^+	<<	Запасающие гранулы
H^+	<<	Окаймленные везикулы

валентных катионов — убаином. В 70-е гг. Л. Е. Нokin было показано, что Na^+ , K^+ -АТФаза, очищенная до гомогенного состояния, при встраивании в лецитиновые липосомы способна обеспечить сопряжение гидролиза АТФ с активным переносом (навстречу друг другу) ионов Na^+ и K^+ со стехиометрией $Na^+/K^+/ATP = 3/2/1$, т.е. той же, что обнаружена и для нативных мембран (эритроцитов). Основной функцией Na^+ , K^+ -АТФазы (Na^+ -насоса), присутствующей

щей в мембранах большинства эукариотических клеток, является установление градиентов ионов Na^+ и K^+ , что служит необходимым условием регуляции объема клетки, внутриклеточного значения рН, процессов дыхания и гликолиза, трансмембранного переноса сахаров, аминокислот и нейротрансмиттеров. В возбудимых клетках градиент Na^+ составляет движущую силу для быстрого его тока внутрь клетки при возбуждении (потенциал действия), для контроля за внутриклеточным содержанием Ca^{2+} через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменный механизм.

Na^+ , K^+ -АТФаза локализована в различных органах и тканях. Особенно велико ее содержание в органах, осуществляющих выделительную функцию (почки, солевые железы) или выполняющих электрическую работу (мозг, электрические органы).

Na^+ , K^+ -АТФаза всегда обнаруживается в наружных плазматических мембранах клеток и является их маркерным ферментом. Она представляет собой интегральный белок, пересекающий мембрану насквозь, контактируя как с внеклеточной средой, так и с цитоплазмой. Гидролитический центр фермента "обращен" внутрь клетки. Изнутри осуществляется также и активация фермента натрием. Присутствие калия требуется снаружи. Как гидролитический центр, так и участки ионной активации располагаются в гидрофильном окружении в тех частях молекулы, которые выступают из фосфолипидного бислоя (рис. 8).

Молекула фермента состоит из двух субъединиц: α (липопротеидной природы), содержащей гидролитический центр, способный фосфорилироваться в присутствии АТР, и β (гликопротеин). α -субъединица (каталитическая) "прошивает" липидный матрикс и несет на себе каталитический центр, центры связывания и переноса ионов натрия и калия, убаина и других сердечных гликозидов (дигиталис-рецептор), ионов магния, других функционально важных продуктов. β -субъединица обеспечивает правильную ориентацию Na^+ , K^+ -АТФазы, отвечает за ее антигенные свойства, участвует в регуляции связывания ионов калия с ферментом. Сиалогликопротеидный компонент обнаружен и в α -субъединице Na^+ , K^+ -АТФазы почек кролика, электрического органа рыб и наплуса креветок. Считают, что α -субъединица, судя по аминокислотному составу, более гидрофобна, хотя β -субъединица связывает большее количество фосфолипидов (табл. 6). Методом амперометрического титрования нитратом серебра установлено наличие в Na^+ , K^+ -АТФазе почек свиньи пяти дисульфидных свя-

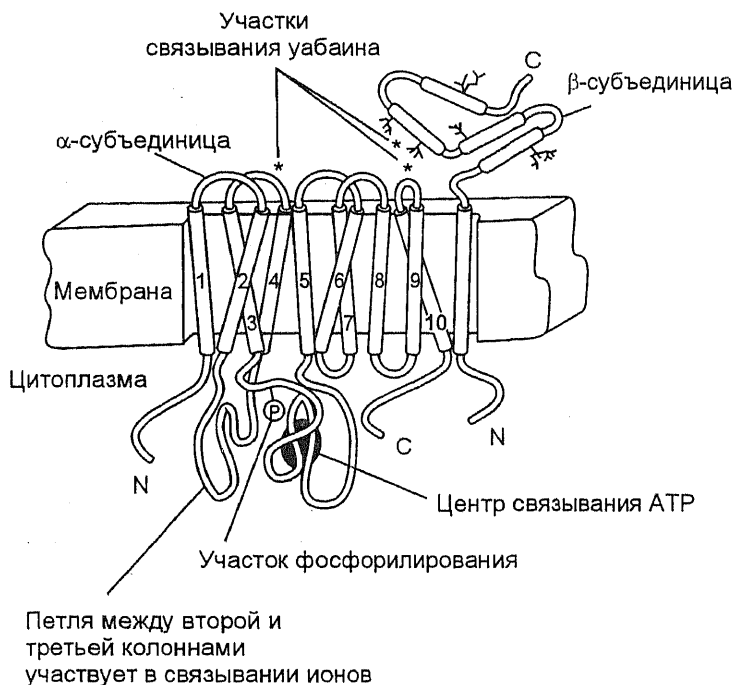


Рис. 8. Схема расположения Na^+ , K^+ -АТФазы в клеточной мембране (А. А. Болдырев, 1998)

зей и 20 свободных остатков цистеина, большинство из которых относится к разряду замаскированных.

Анализ профиля гидрофобности показывает, что в полипептидной цепи α -субъединицы содержится от 6 до 10 потенциальных трансмембранных фрагментов (колонн), состоящих из 17 — 25 аминокислот, уложенных в α -спираль (см. рис. 8). N- и C-концевые фрагменты α -субъединицы располагаются в цитоплазме. N-концевая часть полипептидной цепи представляет собой гибкий неспирализованный участок, обогащенный остатками лизина, который принимает участие в конформационных переходах и, возможно, регулирует чувствительность фермента к катионам. В N-концевой половине α -субъединицы присутствует 4 трансмембранных фрагмента (M1—M4), а в C-концевой половине, по-видимому, еще 6 (M4—M10). Между трансмембранными фрагментами M2 и M3 располагается малая цитоплазматическая петля, а между M4 и M5 — большой цитоплазматический домен, в состав которо-

Таблица 6

*Фосфолипидный и углеводный состав изолированных
α- и β-субъединиц Na⁺, K⁺-АТФазы (А. А. Болдырев, 1985)*

Фосфолипиды, %	α-Субъединица	β-Субъединица
Сфингомиелин	23 ± 6	17 ± 4
Фосфатидилхолин	31 ± 5	37 ± 2
Фосфатидилсерин	11 ± 2	11 ± 2,5
Фосфатидилинозитол	1 ± 1	1 ± 1
Фосфатидилэтаноламин	33 ± 7	33 ± 4,5
Углеводы, моль/100 молей аминокислот	α-субъединица	β-субъединица
Манноза	0,3 ± 0,1	2,5 ± 0,1
Галактоза	0,9 ± 0,1	5,5 ± 0,4
Глюкоза	0,9 ± 0,2	2,0 ± 0,5
Глюкозамин	2,0 ± 0,2	10,1 ± 0,5
Галактозамин	Отсутствует	0,3 ± 0,1
Сialовые кислоты	0,35 ± 0,05	3,2 ± 0,2

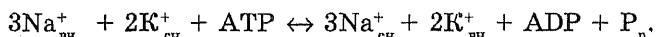
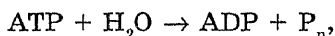
го входит более 400 аминокислотных остатков α-субъединицы. Большой цитоплазматический домен состоит из чередующихся α-спиральных и β-складчатых участков. Характерной его особенностью является наличие центрального ядра, представленного β-структурой, которое окружено α-спиральными участками, соединенными гибкими петлями. АТФ-связывающий центр расположен, вероятно, в С-концевой части β-структуры. В большом цитоплазматическом домене α-субъединицы находится фосфорилируемый остаток аспарагиновой кислоты (Asp 369). Полипептидная цепь β-субъединицы уложена в антипараллельные β-структуры. Все изоформы β-субъединицы содержат три дисульфидные связи (Cys121—Cys150, Cys160—Cys176, Cys215—Cys278 в β1-изоформе).

Молекулярная масса белковых субъединиц в среднем составляет 90—130 (α) и 35—57 (β) кДа. В очищенных препаратах Na⁺, K⁺-АТФазы рядом исследователей отмечено присутствие низкомолекулярного протеолипида с молекулярной массой 10000—15000 выраженной гидрофобной природы. Его называют γ-субъединицей Na⁺-насоса. Предполагают, что подобные протеолипиды способствуют образованию трансмембранных ионных каналов в мембране или обеспечивают взаимодействие олигомерных белков с бислоем.

Основной формой Na^+ , K^+ -АТФазы, встречающейся у млекопитающих, является изофермент $\alpha\beta 1$ -типа. В 1986 г. G. E. Shull et al. опубликовали данные о полной последовательности трех клонов кДНК из мозга крысы, соответствующих трем различным изоформам каталитической субъединицы белка ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) и представляющих собой продукты трех неодинаковых генов. У различных видов животных обнаружено пять изоформ β -субъединицы, входящих в состав Na^+ , K^+ -АТФазы и H^+ , K^+ -АТФазы ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, H , $\text{K}\beta$ и $\beta\text{b}1$).

Деление протомера фермента на α - и β -субъединицы условно: под электронным микроскопом $\alpha\beta$ -протомер выглядит как цилиндр с диаметром 5,4 нм и высотой 8,0 нм. Для проявления функциональной активности фермента необходим по меньшей мере димер с молекулярной массой 265 000. Однако в последнее время получены активные препараты Na^+ , K^+ -АТФазы, находящиеся в мономерном состоянии.

Na^+ , K^+ -АТФаза представляет собой векторную систему первично-активного транспорта, обеспечивающую сопряжение энергии ферментативного гидролиза АТФ с трансмембранным противогradientным переносом Na^+ и K^+ :



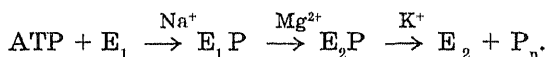
Свободная энергия гидролиза АТФ составляет в условиях клетки ≈ 55 кДж/моль, а для транспорта указанных ионов требуется ≈ 46 кДж/моль, т.е. коэффициент полезного действия натриевого насоса равен 84 %. Натриевый насос работает в электрогенном режиме: за каждый транспортный цикл из клетки “выносятся” один положительный заряд. В результате на внутренней стороне плазматической мембраны создается отрицательный потенциал порядка 90 мВ.

Используя технику миллипорового фильтрования, Y. Топица (1979) обнаружил в ферменте, выделенном в чистом виде из почек свиньи, участки специфического связывания Na^+ (3 моля/моль фермента) и K^+ (2 моля/моль фермента), что согласуется как со стехиометрией транспорта ионов в оптимальных условиях ($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATP} = 3/2/1$), так и с результатами определения коэффициентов кооперативности для ионов, рассчитываемых по активации калием и натрием АТФазной реакции. Коэффициенты Хилла по ионам равны: n_{H} по $\text{K}^+ \sim 1,7$; по $\text{Na}^+ \sim 2,3$. K_d для Na^+

в Na^+ -центрах составляет 0,2—0,3 ммоль/л, а в K^+ -центре — 2,2 ммоль/л. Ион K^+ обнаруживает высокое сродство не только к собственным центрам ($K_d = 0,04$ ммоль/л), но и к Na^+ -центрам. Каждый протомер Na^+ , K^+ -АТФазы содержит один нуклеотид-связывающий центр, локализованный на α -субъединице. В присутствии Na^+ , Mg^{2+} , АТФ он может фосфорилироваться, образуя ацилфосфат на карбоксиле аспарагиновой кислоты. Образование фосфофермента — одна из стадий гидролиза субстрата Na^+ , K^+ -АТФазой, а K^+ обеспечивает его быстрое дефосфорилирование (K_d для АТФ — 0,1+1,0 мкмоль/л). Показано существование двух типов АТФ-связывающих центров, что позволяет получить двух-фазную кривую субстратной зависимости фермента.

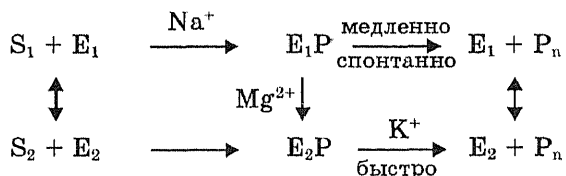
Предложены три гипотезы функционирования фермента (R. W. Albers — R. L. Post, 1969; J. D. Robinson, 1975; K. R. H. Repke, 1979), основанные на результатах как экспериментальных исследований, так и теоретического анализа.

В основу реакционной схемы (A. G. Sen, R. W. Albers, R. L. Post, 1969), включающей стадию, протекание которой требует наличия высокой концентрации Mg^{2+} , положен тот факт, что для процесса фосфорилирования требуется присутствие гораздо меньшего количества Mg^{2+} , чем для полного гидролитического цикла:



Однако этой гипотезе противоречили некоторые экспериментальные данные: одновременная, а не последовательная активация АТФазы ионами Na^+ и K^+ (J. D. Robinson, 1983); образование в реакционном цикле фосфофермента E_1P до фосфофермента E_2P в отсутствие K^+ (Y. Tonomura, 1973).

В соответствии со схемой J. D. Robinson (1975)



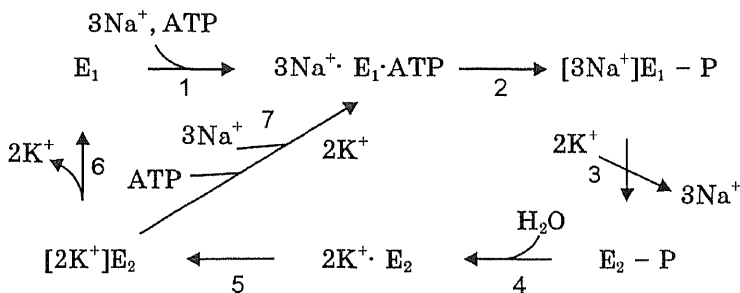
существуют две группы субстратов, гидролизующихся ферментом разными путями: “калиевые субстраты” (S_2) должны взаимодействовать с конформацией фермента E_2 , “натриевые субстра-

ты” — с конформацией E_1 . АТФ проходит путь, включающий обе конформации фермента и стадии активации обоими ионами. Переход $E_2 \leftrightarrow E_1$ сопряжен с отщеплением ADP и изменением сродства к Na^+ и K^+ .

Эта схема согласуется с представлениями о функционировании Na^+ , K^+ -АТФазы в виде димера, протомеры которого работают согласованно, но находятся на разных стадиях ферментативного цикла: активация натрием одного протомера совпадает по времени с активацией калием другого.

Согласно гипотезе К. Р. Н. Керке (1979) Na^+ , K^+ -АТФазная активность осуществляется мономерной формой фермента. Присутствие K^+ переводит фермент в димерную форму. В этих условиях присоединение АТФ к центру с низким сродством к субстрату индуцирует “сбрасывание” ADP с соседнего центра, обладающего высоким сродством. Это синхронизирует работу димера в противофазе так, что эндергоническая стадия ферментативной реакции у одного протомера совпадает по времени с экзергонической стадией реакции, осуществляемой другим протомером. В пользу этой гипотезы служат результаты исследований, свидетельствующие о существовании геометрических различий между нуклеотидсвязывающими центрами двух типов, соответствующих двум значениям K_M для АТФ.

Однако различные модификации схемы R. W. Albers — R. L. Post не имеют принципиальной разницы и основаны на воззрениях, согласно которым каталитический цикл Na^+ , K^+ -АТФазы представляет собой чередование двух основных конформаций фермента (E_1 и E_2) в фосфорилированном и дефосфорилированном состояниях:



Катализ начинается, когда фермент находится в конформации E_1 . Эта конформация обладает высоким сродством к АТФ и

ионам натрия с цитоплазматической стороны мембраны. Связывание ионов натрия активирует фосфорилирование фермента по остатку аспарагиновой кислоты. Добавление ионов калия к фосфоферменту активирует гидролиз ацилфосфатной связи и приводит к освобождению неорганического фосфата, причем ион K^+ действует с внеклеточной стороны мембраны. В формировании представлений о механизме переноса ионов через мембрану сыграло свою роль открытие в середине 80-х гг. окклюдированных (поглощенных) катионов. Было установлено, что на определенных стадиях каталитического цикла ионы натрия и калия оказываются недоступными с обеих сторон мембраны, т.е. окклюдированы внутри последней.

Открытие окклюдированных ионов явилось дополнительным аргументом в пользу модели транспорта катионов Na^+ , K^+ -АТФазой, описывающей перенос катионов через мембрану как их перемещение через канал с калиткой (P. Lauger, 1991). Согласно этой модели (рис. 9) катионы перемещаются через канал, образуемый полипептидной цепью α -субъединицы фермента. При этом вокруг катиона происходит формирование энергетического барьера (калитки), которая открывается и закрывается при фосфорилировании — дефосфорилировании белка. Собственно перемещение ионов представляет собой серию дискретных стадий, когда катион, соединившийся с катион-связывающим центром (при этом канал открыт только с одной стороны), переходит в окклюдированное состояние внутри канала (канал открыт с обеих сторон), а затем освобождается с противоположной стороны мембраны (канал открыт с противоположной стороны мембраны).

Т. Нехум et al. (1970), изучая влияние pH на K_m и v_{max} мембраносвязанной Na^+ , K^+ -АТФазы из ткани мозга крысы, показали наличие в фермент-субстратном комплексе ионизирующихся групп со значениями pK: 7,1; 7,5; 7,6, которые соответствуют величинам pK для аминокислот гистидина, цистина и α -аминокислот соответственно.

А. В. Кравцовым (1978) при исследовании солубилизированной дигитонином Na^+ , K^+ -АТФазы из ткани мозга быка было показано, что в фермент-субстратном комплексе выявляются две ионизирующиеся группы со значениями pK 7,25 и 7,70 (т.е. близкими к приведенным выше значениям для мембраносвязанного фермента) — рис. 10, а. Величины pK этих групп соответствуют значениям для α - NH_2 -групп аминокислот и α - NH_2 -группы дис-

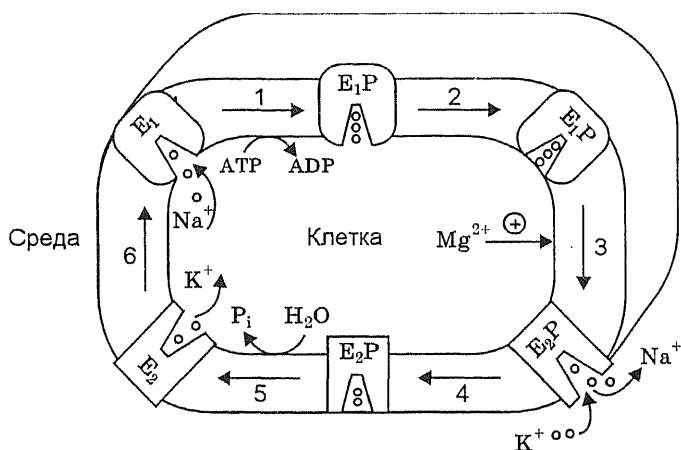


Рис. 9. Схема реакционного цикла Na^+ , K^+ -АТФазы (А. А. Болдырев, 1998)

Примечание. Шесть основных последовательных реакций включают связывание ионов натрия E_1 -конформером, его взаимодействие с АТФ и образование фосфорилированного интередиата (стадия 1), окклюзию ионов Na^+ конформацией E_1P (стадия 2), активируемый ионами Mg^{2+} переход $\text{E}_1\text{P} \rightarrow \text{E}_2\text{P}$, приводящий к высвобождению ионов Na^+ во внеклеточную среду и связыванию с ионным центром внеклеточного калия (стадия 3), окклюдирование ионов K^+ (стадия 4), дефосфорилирование фермента, вследствие которого ионы K^+ высвобождаются во внутриклеточное пространство (стадия 5), и переход конформации E_2 в конформацию E_1 , обуславливающий начало нового цикла (стадия 6).

тина. $K_{\text{M,ATP}}$ для сольубилизированной Na^+ , K^+ -АТФазы зависит от рН среды: при переходе от физиологических значений рН в щелочную область K_{M} существенно уменьшается (рис. 10, б). Кривая зависимости $\text{p}K_{\text{M}}$ от величины рН представляет собой восходящую ветвь, что свидетельствует о присутствии в фермент-субстратном комплексе ионизирующей группы с $\text{p}K$ 7,60. Таким образом, и в случае гидролиза субстрата сольубилизированным ферментом процесс контролируется аминокруппами со значениями $\text{p}K$ в узком интервале рН: 7,25 — 7,70.

К моменту создания модели активного центра Na^+ , K^+ -АТФазы, реконструированной с помощью методов ЯМР- и ЭПР-спектроскопии, не была установлена природа группы, высвобождающей протон при переходе из К-формы в Na-форму (или акцептирующей его при превращении). Ею может быть NH_2 -группа ли-

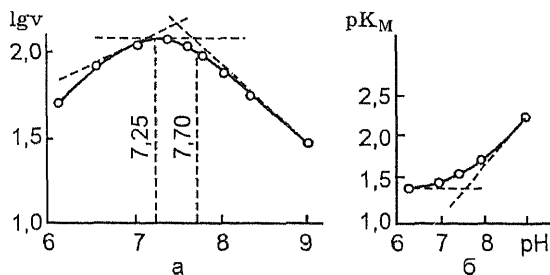


Рис. 10. Зависимость активности сольубилизованной Na^+ , K^+ -АТФазы от pH: а — pH-зависимость Na^+ , K^+ -АТФазы ($\lg v = f(\text{pH})$); б — зависимость $K_M(\text{АТФ})$ Na^+ , K^+ -АТФазы от pH

зина (J. Skou, 1983) или ОН-группа тирозина, имеющая близкое значение pK ($\sim 8,0$). Обе группы идентифицированы в активном центре Na^+ , K^+ -АТФазы.

Для Na^+ , K^+ -АТФазы обнаружена нелинейная зависимость ферментативной активности от температуры в координатах Аррениуса (рис. 11). В температурном интервале 10 — 35 °С наблюдается “перегиб” на графике Аррениуса в области 20 °С, при этом энергия активации каталитической реакции повышается с 18 ккал/моль при температурах выше 20 °С до 30 ккал/моль при более низких температурах (А. А. Болдырев, 1988). На основании результатов сравнительного изучения температурной зависимости активности Na^+ , K^+ -АТФазы и исследования методом ЭПР параметров, характеризующих структурное состояние мембранных липидов, автором сделано заключение о том, что конформационный переход молекул фермента при изменении температуры в состояние с более высокой энергией активации обусловлен фазовыми перестройками липидного окружения при условии взаимодействия белковых молекул с липидным матриксом с участием гидрофобных и электростатических сил. Примечательным

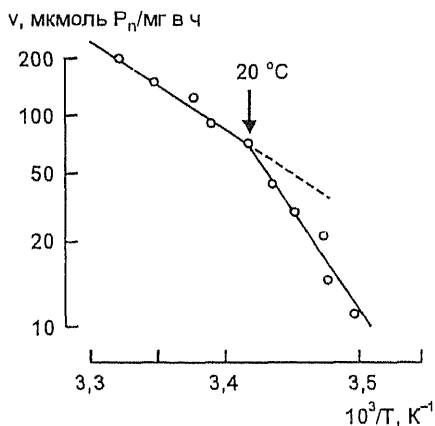


Рис. 11. Температурная зависимость начальной скорости гидролиза АТФ Na^+ , K^+ -АТФазой мозга

является тот факт, что нелинейный характер графиков Аррениуса для Na^+ , K^+ -АТФазы наблюдается лишь в случае использования в качестве субстрата АТР, что свидетельствует о выполнении последним не только функции субстрата, но и модификатора.

Na^+ , K^+ -АТФаза способна гидролизовать большое количество субстратов: нуклеозидтрифосфаты, ацетилфосфат, умбеллиферонфосфат, карбамоилфосфат, динитрофенилфосфат, β -фурилакрилоилфосфат. Сложная кинетика ферментативной реакции, характеризующаяся наличием двух значений K_m , проявляется только при гидролизе АТР и СТР; превращения других субстратов подчиняются кинетике Михаэлиса. Na^+ , K^+ -АТФаза активируется при одновременном присутствии ионов Na^+ и K^+ в среде. Вид зависимости активности фермента от соотношения Na^+/K^+ определяется природой субстрата реакции.

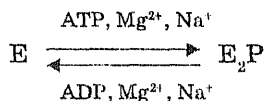
Считают, что структурной единицей Na^+ , K^+ -АТФазы является димер $(\alpha\beta)_2$, а минимальной функциональной единицей — $(\alpha\beta)$ -протомер (или α -субъединица). Олигомерный ансамбль $((\alpha\beta)_2)$ -димер) АТФазы поддерживается в основном за счет взаимодействий α -субъединиц с цитоплазматической стороны в “районе” АТР-связывающих центров, что обеспечивает стабильность четвертичной структуры, необходимой для проявления функциональной активности белка. Вместе с тем с функциональной точки зрения каждая α -субъединица в стабилизированном состоянии обладает полной гидролитической и транспортной активностью. Однако вопрос о биологической роли олигомеров фермента, образуемых в мембране, изучен далеко не полностью. По-видимому, наличие олигомерной структуры Na^+ , K^+ -АТФазы обеспечивает возможность реализации “гибких механизмов”, контролирующих активность мембраносвязанного фермента (см. раздел 2.3.3).

Данные, касающиеся кооперативных взаимодействий между ионными центрами и гидролизующими субстрат участками, служат основой для представлений о том, что Na^+ , K^+ -АТФаза не только структурно организована, но и использует взаимодействия между протомерами для регуляции их активности. При этом величины коэффициента Хилла n_H по ионам-активаторам отражают взаимодействие между ионными центрами, локализованными на каждом протомере, а по субстрату — взаимодействие между протомерами. Чувствительность n_H по АТР к фазовому состоянию мембранных липидов подтверждает, что эта величина отражает взаимодействие разных протомеров АТФазного комп-

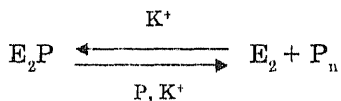
лекса. Напротив, независимость величин p_H по ионам-активаторам от фазового состояния мембраны свидетельствует о том, что взаимодействующие ионные центры находятся на одном и том же протомере.

Характеризуя натриевый насос эритроцитов, I. M. Glynn и S. J. Karlish указали на существование четырех “дискретных режимов” его работы, соответствующих определенным частным биохимическим реакциям АТФ-фосфогидролазной последовательности: 1) Na^+/K^+ -обмена; 2) несопряженного выхода из клетки Na^+ ; 3) Na^+/Na^+ -обмена; 4) K^+/K^+ -обмена.

При отклонении от оптимальных условий насосная функция Na^+ , K^+ -АТФазы существенно изменяется. В отсутствие K^+ во внешней среде и в присутствии Na^+ с обеих сторон мембраны система осуществляет эквимоларный обмен ионов Na^+ через мембрану, измеряемый с помощью изотопов Na^+ . Для этого процесса требуется присутствие АТФ и АДФ. Негидролизуемые аналоги АТФ, в том числе β, γ -NH-АТФ, заменить аденозинтрифосфат не могут (I. M. Karlish, S. Y. Glynn, 1975). Na^+/Na^+ -обмен сопровождается АТФ/АДФ-обменом:



Аналогичным образом в отсутствие внутриклеточного Na^+ , но в присутствии K^+ с обеих сторон мембраны Na^+ -насос осуществляет неэлектрогенный обмен K^+ через мембрану, не приводящий к созданию калиевого градиента. При этом требуется присутствие внутриклеточного P_H или АТФ. K^+/K^+ -обмен осуществляется одновременно с реакцией:



В отсутствие K^+ и Na^+ во внешней среде Na^+ -насос может обеспечивать несопряженный выброс Na^+ , осуществляющийся в процессе гидролиза АТФ. Стехиометрия работы насоса в этом режиме составляет 2—3 иона Na^+ на 1 моль АТФ.

Na^+ -АТФазная реакция отличается по ряду свойств от Na^+ , K^+ -АТФазной реакции: она подчиняется кинетике Михаэлиса, имеет линейный график Аррениуса, требует меньшей концентрации MgCl_2 и ингибируется высокими концентрациями АТФ, хотя почти не-

чувствительна к P_n . Разница между несопряженным и сопряженным выбросами Na^+ состоит в чувствительности к АТФ. Несопряженный выброс Na^+ достигает максимальной скорости уже при 1 мкмоль/л АТФ, а Na^+/K^+ -обмен требует миллимолярных концентраций субстрата. Следовательно, два типа функционирования Na^+ -насоса, как и два способа работы АТФазы, отличаются функционированием лишь субстратных центров с высоким сродством (Na^+ , K^+ -АТФаза) или обоих типов субстратных центров.

Чувствительность Na^+ , K^+ -АТФазы и Na^+ -насоса к одновалентным катионам одинакова. Этот факт можно рассматривать как доказательство идентичности центров активации Na^+ , K^+ -АТФазы натрием и калием и центров, обеспечивающих их транслокацию. Об этом же свидетельствует соответствие стехиометрии транспорта ионов ($Na^+/K^+ = 3/2$) количеству ионсвязывающих участков на одной молекуле фермента.

Процесс переноса ионов через мембрану с помощью натриевого насоса не требует затрат энергии, если исключить работу по переносу некомпенсированного заряда Na^+ против трансмембранного потенциала при электрогенном транспорте. На это указывает существование в схеме натриевого насоса Na^+/Na^+ и K^+/K^+ -обменов, для которых АТФ требуется лишь как кофактор, но не источник энергии. Можно предполагать, что энергия АТФ при работе Na^+ , K^+ -АТФазы затрачивается на "узнавание" ионов Na^+ и K^+ , т.е. на связывание и сбрасывание ионов с "нужной" стороны мембраны. В норме катионы связываются с той ее стороны, где их мало, а сбрасываются туда, где их концентрация велика. Такие изменения сродства ионсвязывающих центров сопряжены с конформационными изменениями фермента, которые и являются главными энергоакцепторными стадиями реакции.

Ионы Na^+ и K^+ транспортируются Na^+ -насосом в частично дегидратированном состоянии. Модификаторы гидрофобных взаимодействий влияют в первую очередь на калиевую активацию, а вещества, разрушающие водородные связи, — на натриевую. Из этого можно сделать вывод, что связывание Na^+ опосредовано "жесткими" структурами белка, стабилизированными водородными связями наподобие ионофорных структур. Ионы Na^+ дегидрируются при переходе из водной фазы в полярную полость молекулы фермента. Ионы K^+ дегидрируются при переходе в гидрофобную область молекулы. Следовательно, Na^+ , K^+ -АТФаза "различает" ионы Na^+ и K^+ , используя различные пути их гидра-

тации. При отсутствии внеклеточного $K^+ Na^+/K^+$ -насосы могут осуществлять электрогенный транспорт протонов, и этот транспорт осуществляется, по-видимому, конформацией E_2 насосов.

К ингибиторам Na^+ , K^+ -АТФазы относятся олигомицин, убаин, диметилсульфоксид, уксусный альдегид, дигитонин, тимерозал, этилмеркуриат. Вместе с тем необходимо отметить, что действие этих соединений на Na^+ , K^+ -АТФазную активность может быть различным.

Механизм действия модификаторов трудно поддается классификации: здесь есть агенты направленного действия (SH-реагенты: тимерозал, этилмеркуриат, уксусный ангидрид), вещества, модифицирующие гидрофобные взаимодействия (диметилсульфоксид, олигомицин, дигитонин), специфический ингибитор Na^+ , K^+ -АТФазы убаин (строфантин G), препятствующий гидролизу фосфорилированного фермента. Гидролиз одним и тем же ферментом разных субстратов в различных условиях неодинаково чувствителен к модификаторам, что можно объяснить тем, что исследуемые "частные" реакции ферментативной активности осуществляются разными олигомерными состояниями Na^+ , K^+ -АТФазы.

Таким образом, на современном уровне знаний Na^+ , K^+ -АТФаза представляется олигомером, в котором взаимодействие между протомерами выражено сильнее, чем между глобулами белка и его липидным окружением. Количество протомеров в таком комплексе определяется, по-видимому, той конформацией белка, которую ему диктует липидное микроокружение. Сами взаимодействия между протомерами контролируются липидами. Показано, что взаимодействия между протомерами фермента в процессе гидролиза АТФ не остаются постоянными: доля крупных ассоциатов АТФазы возрастает на стадии взаимодействия ее с ионами калия, а подвижность этих ассоциатов в мембране резко увеличивается при связывании АТФ.

Особый интерес представляет проблема вовлечения Na^+ , K^+ -АТФазы в общие пути передачи сигнала в клетке, а также ее фосфорилирование протеинкиназами и взаимодействие с внутриклеточными белками (см. главу 2). Установлено, что α -субъединица фермента является мишенью для сАМР-зависимой протеинкиназы (протеинкиназы А) и фосфолипидзависимой протеинкиназы С и ионов кальция. Противоречивые данные (ингибирование, активация, отсутствие эффекта) о характере влияния

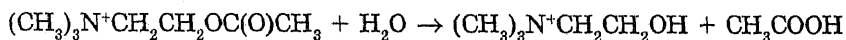
фосфорилирования Na^+ , K^+ -АТФазы протеинкиназой А связывают с зависимостью “ответной реакции” белка от его конформационного состояния, изменяющегося в результате взаимодействия фермента с белками цитоскелета, в частности, активном. Однако более детальные исследования по этому вопросу пока отсутствуют.

1.2.5. Структура, функциональные и некоторые физико-химические свойства ацетилхолинэстеразы

Один из важнейших биохимических механизмов, лежащих в основе деятельности нервной системы, — это химический процесс, связанный с биосинтезом, выделением и распадом ацетилхолина. Скорость ферментативного гидролиза последнего играет ключевую роль в функционировании нервной системы. Изменения в кинетике ферментативного разрушения ацетилхолина приводят к серьезным нарушениям функций этой системы. Одна из областей фармакологии разрабатывает способы лечения заболеваний нервной системы путем применения лекарственных средств, влияющих на кинетические параметры гидролиза ацетилхолина холинэстеразами.

После обнаружения Дейлом в 1914 г. в крови фермента, катализирующего процесс расщепления ацетилхолина, было показано широкое распространение этого фермента в различных тканях животных. В 40-е гг. было высказано предположение о существовании двух основных типов ферментов, гидролизующих эфиры холина, — “истинных холинэстераз” и “псевдохолинэстераз”. Эти ферменты относятся к сериновым гидролазам и соответствуют двум группам биологических катализаторов: ацетилхолинэстеразе (ацетилгидролаза ацетилхолина, КФ 3.1.1.7) и холинэстеразе (ацилгидролаза ацилхолинов, КФ 3.1.1.8). Холинэстеразы наряду с гидролизом ацетилхолина могут участвовать также в межклеточных взаимодействиях. С этим связана специфическая экспрессия холинэстераз в эмбриогенезе в определенных структурах до формирования холинэргических синапсов, а также обнаружение их в нехолинэргических тканях.

Ферментативное расщепление ацетилхолина представляет собой реакцию гидролиза, протекающую с образованием уксусной кислоты и холина:



Основное назначение холинэстеразы нервной ткани — быстрый гидролиз выделяющегося ацетилхолина, без которого невозможна передача нервных импульсов. Обнаружено, что ферментативный гидролиз ацетилхолина может осуществляться не только нервной, но и другими тканями: присутствие холинэстеразы было выявлено в сыворотке и эритроцитах крови, в мышечной ткани, печени, поджелудочной железе. Считают, что холинэстераза эритроцитов играет важную роль в клеточной проницаемости. Холинэстераза крови и тканей рассматривается как своеобразный защитный (“аварийный”) фермент на случай значительных выходов в кровяное русло ацетилхолина при перевозбуждении нервной системы.

К ацетилхолинэстеразам относятся ферменты нервной ткани и эритроцитов, а к холинэстеразам — ферменты сыворотки крови, печени, поджелудочной железы и других органов. Ацетилхолинэстераза катализирует гидролиз ацетилхолина и ацетил- β -метилхолина и не влияет на гидролиз бензоилхолина и бутирилхолина. Холинэстераза катализирует гидролиз бутирилхолина, ацетилхолина, бензоилхолина и пропионилхолина, но не действует на ацетил- β -метилхолин. Активность ацетилхолинэстеразы характеризуется отчетливым максимумом при концентрации ацетилхолина $\sim 2 \cdot 10^{-4}$ моль/л и тормозится при ее увеличении, в то время как на активность холинэстеразы не влияет избыток ацетилхолина. Оптимум pH-действия составляет для ацетилхолинэстеразы 7,5—8,0, а для холинэстеразы — 8,5 (рис. 12).

В каталитическом действии холинэстераз обоего типа принимает непосредственное участие гидроксильная группа одного из остатков серина, расположенного на активной поверхности фермента. Однако такой гидроксил должен быть специфически активирован, чтобы приобрести способность к участию в каталитическом действии. Эта активация может быть осуществлена путем взаимодействия с группировкой белковой молекулы, характеризующейся величиной pK 5,8—7,0. Предполагают, что такой группировкой является остаток гистидина. Доказано наличие в холинэстеразах обоего типа анионной группировки, несущей единственный отрицательный заряд и взаимодействующей с катионной группировкой субстрата — ацетилхолина, а также катион-содержащих ингибиторов. В активном центре холинэстеразы вблизи серина находится остаток глутаминовой кислоты. Проведены расчеты электростатического потенциала и электрического

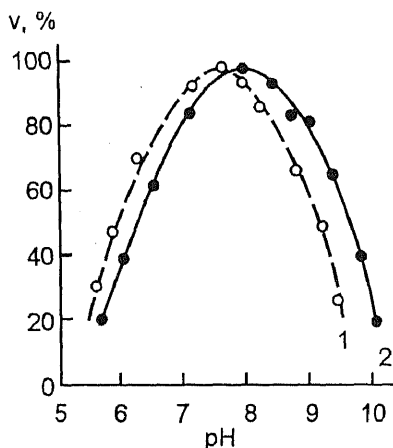


Рис. 12. Зависимость скорости гидролиза ацетилхолина от pH для ацетилхолинэстеразы *Torpedo marmorato* (1) и холинэстеразы сыворотки крови (2)

на, — в качестве постулированной Уилсоном нуклеофильной группировки эстеразного центра; ионизированная карбоксильная группа — в качестве анионного центра; гидроксил тирозина — в качестве кислотной группы эстеразного центра.

Считают, что каталитический процесс (рис. 13) начинается с образования электростатической связи между катионом субстрата и анионной группировкой фермента. Нейтрализация отрицательного заряда одной из групп белковой молекулы в сочетании с взаимодействием трех метильных групп при атоме азота ацетилхолина с окружающими анионный центр группами приводит к существенным изменениям конформации фермента. В результате этого группировки эстеразного центра и соответствующие группы субстрата занимают положение, обеспечивающее установление “наилучшей” комплементарности, а затем образуются связи между углеродом поляризованной карбонильной группы и кислородом гидроксильной группы серина и, возможно, между эфирным кислородом и водородом кислотной группировки (остаток тирозина). Далее происходит переход протона к холину с образованием ацетилированного по гидроксилу фермента и протонированного имидазола. Следующий элементарный акт с участием воды осуществляется после того, как молекула холина по-

поля вокруг наиболее важного в каталитическом отношении “горла” ацетилхолинэстеразы, включающего серин, гистидин и глутамат. Из результатов исследования pH-зависимости действия холинэстераз следует, что их активность связана с функциями группировки, рК которой составляет 8,5—10,0. К таким группировкам может быть отнесен гидроксил тирозина. В образовании фермент-субстратного комплекса ацетилхолинэстеразы участвует в качестве обязательных не менее трех связей. Во всех современных схемах механизма действия холинэстераз фигурируют: гидроксил серина, связанный с имидазолом гистидина,

кинет анионный центр фермента и восстановится отрицательный заряд анионной группировки. Молекула воды образует связи с карбонильным кислородом и кислородом тирозина, в результате чего происходит переход протона к гидроксиду серина. При этом выделяется второй продукт реакции — уксусная кислота — и регенерируется фермент в исходной конформации.

Эксперименты Е. Krejci и соавт. (1991) с направленным мутагенезом показали, что консервативный для эстераз и липаз остаток аспарагиновой кислоты необходим для осуществления ими каталитических функций. По-видимому, электростатические особенности поверхности молекулы ацетилхолинэстеразы не влияют на скорость катализа, которая не зависит от диффузии молекул субстрата, а стабилизация переходных состояний в каталитическом центре нечувствительна к электростатическим взаимодействиям.

Для выделения ацетилхолинэстеразы из эритроцитов используют метод экстракции фермента из стромы щелочным буфером в присутствии нейтрального детергента Твин-20 с последую-

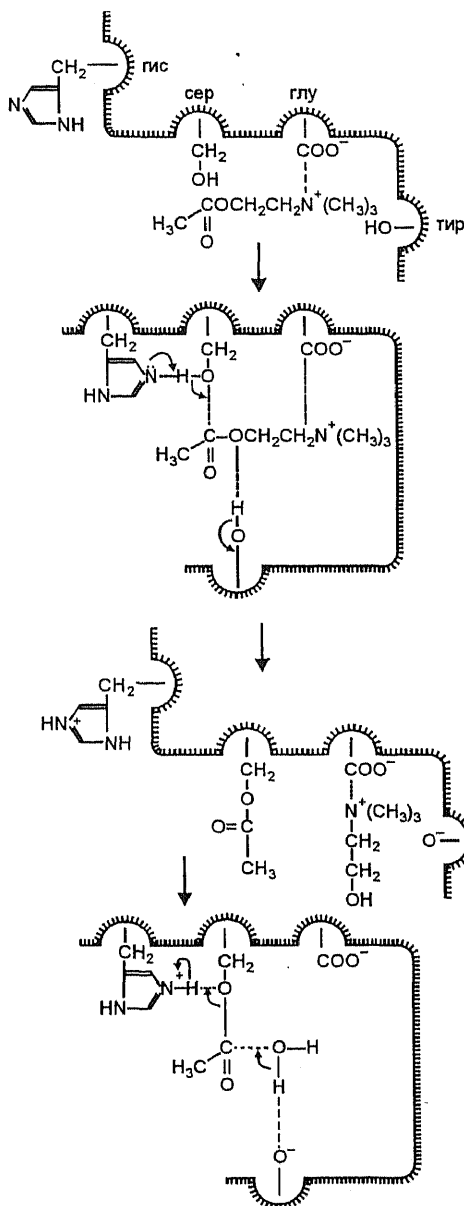


Рис. 13. Схема механизма действия холинэстераз

щим фракционированием сульфатом аммония и отделением гемоглобина с помощью кальций-фосфатного геля. Молекулярная активность (т.е. число молекул субстрата, претерпевающих превращение на одном активном (каталитическом) центре фермента в 1 мин в условиях насыщения фермента субстратом) ацетилхолинэстеразы составляет $\sim (3-3,5) \cdot 10^5 \text{ мин}^{-1}$ и превышает в 4—5 раз таковую для холинэстеразы сыворотки крови.

Зависимость $\lg v$ от $1/T$ для ферментативного гидролиза эфиров холина холинэстеразой сыворотки крови лошади (график Аррениуса) в интервале температур 10—25 °C является линейной (рис. 14). В случае гидролиза ацетил- β -метилхолина константа Михаэлиса не зависит от температуры, для ацетилхолина и бен-

зоилхолина — незначительно растет по мере ее повышения, а для бутирилхолина — существенно увеличивается.

Ацетилхолинэстераза эритроцита расположена на внешней поверхности мембраны и составляет 0,2—0,3 % от всего мембранного белка. Она является гликопротеином, в состав которого входят гликановые компоненты, содержащие последовательность: этаноламин — фосфатманноза — глюкозамин — инозитол. Фермент может быть экстрагирован в форме активного липопротеина при обработке мембраны растворами высокой ионной силы, Na-дезоксихолатом или тритоном X-100. Удаление липида приводит к полной потере активности фермента, а последующее добавление фосфатидилсерина (липид, с которым он выделяется из мембраны) — к восстановлению ее функциональных свойств.

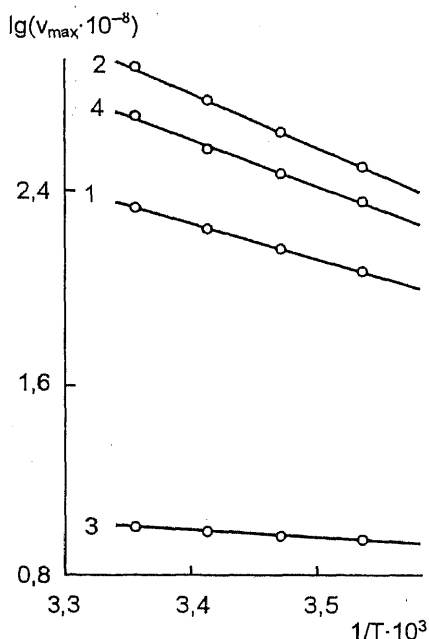


Рис. 14. Зависимость $\lg v$ от $1/T$ для ферментативного гидролиза эфиров холина при действии холинэстеразы сыворотки крови лошади: 1 — ацетилхолин; 2 — бутирилхолин; 3 — ацетил- β -метилхолин; 4 — бензоилхолин

Ацетилхолинэстераза состоит из двух одинаковых субъединиц с молекулярной массой, равной 70—90 кДа. Каждая субъединица имеет два центра связывания: активный и аллостерический. Активность фермента зависит от ионного состава среды и специфически ингибируется ионами тетраметиламмония, производными карбаминовой кислоты и фосфоорганическими соединениями. Показано, что хлорпирофосметил (ХПМ) является сильным неконкурентным ингибитором ацетилхолинэстеразы из эритроцитов человека. При растворении ацетилхолинэстеразы в тритоне X-100 ее активность и кинетические свойства не изменяются, а также сохраняется чувствительность к ХПМ. Предполагают, что на участки связывания ацетилхолинэстеразы и ХПМ не влияет гидрофобное окружение мембран эритроцитов. Ацетилхолинэстераза является *аллотопным ферментом*: каталитические свойства ее существенно различаются в растворе и в составе биомембран.

Каталитическая активность мембранной ацетилхолинэстеразы находится под контролем структурного состояния липидной фазы эритроцитарной мембраны. Фосфолипазы (A_2 , C и D) оказывают на мембраны близкое модифицирующее действие, хотя они характеризуются не только различной специфичностью (природой разрываемых в липидах связей), но и пространственной асимметрией действия. Панкреатическая фосфолипаза A_2 и фосфолипаза D гидролизуют липиды, расположенные на обеих сторонах эритроцитарной мембраны, а фосфолипаза C гидролизует фосфолипиды, расположенные на внутренней ее стороне. Модификация липидного бислоя с внутренней стороны мембраны приводит к изменению структурного состояния липидов, а затем и белков, расположенных снаружи. Косвенным свидетельством возможности такой трансмембранной передачи структурного сигнала может служить отрыв ацетилхолинэстеразы от мембраны под влиянием фосфолипазы C (И. Д. Волотовский и соавт., 1987). Обработка любыми фосфолипазами как бы превращает мембраносвязанный фермент в квазисвободный.

Следует отметить, что поскольку функциональные свойства ацетилхолинэстеразы существенно зависят от структурного состояния мембраны, то определение уровня ее активности используют в качестве конформационного маркера для оценки различного рода модификаций мембранных компонентов под влиянием физико-химических факторов (см. главу 4).

Кроме того, активность холинэстераз изменяется при многих патологических процессах: заболеваниях печени, почек, остром инфаркте миокарда, онкозаболеваниях, в послеоперационном периоде, при интоксикации фосфорорганическими соединениями, поэтому эта характеристика белковой молекулы может быть использована в энзимодиагностике.

1.3. УГЛЕВОДЫ МЕМБРАН

Углеводные компоненты биомембран входят в состав гликолипидов, гликопротеинов и мукополисахаридов. В табл. 7 суммированы сведения о составе, локализации и функциях выше-названных структурных элементов мембран.

Т а б л и ц а 7

Углеводные компоненты биомембран

Соединения	Углеводные компоненты	Другие компоненты	Локализация	Функции
Гликолипиды (гlicosфинголипиды)	Глюкоза, галактоза, производные аминосахаров глюкозамина и галактозамина, фукоза, сиаловые кислоты	Церамид, N-ацильное производное сфингозина	Плазматическая мембрана, мембрана митохондрий и эндоплазматической сети	Участие в межклеточных взаимодействиях, обеспечение антигенных свойств мембран
Гликопротеины	4—8 остатков сахаров: глюкоза, галактоза, манноза, производные глюкозамина и галактозамина	Белки (гликозильную связь образуют аспарагиновая и глутаминовая кислоты, серин, треонин)	Плазматические мембраны, мембраны эндоплазматической сети	Обеспечение антигенных свойств мембран, участие в иммунологических реакциях; в процессе — посттрансляционном формировании сложных молекул со специфическими функциями; в стабилизации белковых молекул
Мукополисахариды				
Гиалуроновая кислота	Мономер — дисахарид (глюкуроновая кислота + ацетилглюкозамин)		Плазматическая мембрана	Участие в формировании поверхностного потенциала, в осуществлении межклеточных контактов и транспорте веществ
Хондроитин-сульфат	Глюкуроновая кислота + ацетилгалактозамин	Сульфат		

В состав клеточных мембран некоторых организмов входит хитин — гомополимер ацетилглюкозамина (у беспозвоночных животных), муреин или пептидогликан (у бактерий), мономером которого является дисахарид мунопептид (ацетилглюкозамин + ацетилмурамовая кислота).

В плазматической мембране количество углеводов невелико по сравнению с белками и липидами и составляет от 2 до 10 % сухой массы мембран. В распределении углеводов также, как белков и липидов, наблюдается асимметрия: они локализованы на той стороне мембраны, которая не контактирует с цитозолем. В качестве биохимического маркера для изучения локализации и выделения локусов плазматической мембраны, содержащих углеводы, используют лектины — белки растительного и животного происхождения, специфически связывающие сахара. Их называют углеводраспознающими белками, отличающимися от ферментов и антител и не вызывающими химических превращения в распознаваемом лиганде.

К классу лектинов (фитогемагглютининов), которые способны агглютинировать клетки млекопитающих, относится конканавалин А. Он является гликопротеином, состоящим из двух субъединиц (изолектинов) с молекулярной массой 260 кДа; каждая содержит 237 аминокислотных остатков; при $pH > 7,0$ представляет собой тетрамер. Этот гликопротеин имеет два центра связывания Ca^{2+} , два центра связывания других металлов, два центра связывания сахаров. Конканавалин А способен к взаимодействию со специфическими углеводными группами на поверхности клеток, а именно с D-глюкозой и D-маннозой интегральных белков и, в частности, гликофоринов. Образует нерастворимые комплексы с биополимерами, содержащими множественные α -D-глюкопиранозильные, α -D-маннопиранозильные и β -D-фруктофуранозильные остатки в качестве невосстанавливающих концов.

Лектины имеют важное практическое значение для медицины, связанное с их способностью “различать” эритроциты трех групп крови (А, В, О) по структуре олигосахаридных компонентов гликофорина. Специфические гликопротеины обнаруживаются на поверхности не только эритроцитов, но и других клеток живых тканей. Именно вследствие наличия этих гликопротеинов при трансплантации органов необходима идентичность тканей донора и реципиента. Кроме того, установлено, что некоторые лектины вызывают избирательную агглютинацию злокаче-

ственных опухолевых клеток, указывающую на различия в структуре их поверхности по сравнению с нормальными клетками. Связывание лектинов с поверхностью плазматической мембраны может индуцировать изменения в расположении поверхностных белков и гликопротеинов, физическом состоянии липидов мембран, проницаемости их для различных веществ и активности мембранных ферментов.

Выявлены основные типы взаимодействий, приводящих к образованию углевод-белковых комплексов с участием лектинов: гидрофобные взаимодействия боковых радикалов аминокислот с пиранозными циклами сахаридов; водородные связи между атомами боковых радикалов Asn, Asp, Arg, амидных и карбонильных групп углеводраспознающего сайта и гидроксилами сахаридных остатков; ван-дер-ваальсовы взаимодействия; участие молекул воды в образовании водородных связей; участие ионов двухвалентных металлов в комплексообразовании (О. С. Мирошниченко, 1999). Установлено, что в распознавании лектинами остатков Gal, в отличие от остатков Glu и Man, большую роль играет положение в гексозах гидроксила 4-ОН. Углеводраспознающие сайты могут быть сформированы различными участками полипептидной цепи. Получены доказательства способности лектинов распознавать помимо углеводных функционально подобные пептидные лиганды (по карбогидратнезависимому пути). Были идентифицированы пептиды, имитирующие связывание метил- α -D-маннозида и α -D-маннозы с конканавалином. Считают, что лектины и лектиноподобные белки, которые представляют собой мультидоменные молекулы, вовлекаются в различные типы взаимодействий с разными веществами при участии отличных от углеводраспознающих доменов. Критическим параметром лиганда для успешного распознавания лектинами является его конформация. В заключение следует подчеркнуть, что лектины способны участвовать в широком спектре регуляторных процессов: эмбриогенезе, иммунологических реакциях, онкогенезе, белковом синтезе и др.

1.4. ТИПЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕМБРАННЫХ КОМПОНЕНТОВ И ИХ РОЛЬ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ БИОМЕМБРАН

В природной мембране взаимосвязь белковой молекулы с липидным бислоем определяется, по всей вероятности, балансом

водородных связей, электростатических и ван-дер-ваальсовых взаимодействий между липидом, водой и “соседними” белковыми молекулами. Липид-белковые взаимодействия условно подразделяют на взаимодействия типа белок-липидный монослой, белок-липидный бислой, а также липид-белковые взаимодействия, включающие липид-зависимые ферменты.

Термин “пограничный липидный слой” был введен в связи с появлением и развитием концепции о существовании особого “стационарного” слоя липидов, связанного с поверхностью белковой молекулы, в котором физико-химические параметры липидов отличаются от таковых в основной части бислоя. Под “стационарностью” понимают отсутствие липидного обмена за время, сравнимое с временем оборота фермента ($\approx 10^{-3}$ с). Пограничные липиды называют также *аннулярными*. В то же время нет убедительных экспериментальных доказательств различного поведения пограничных липидов и липидов основной части бислоя. Это связано с использованием разных методов исследования, для которых характерны неодинаковые временные интервалы изучения динамики липидных молекул.

В 70-е гг. первым исследованием упаковки липидов вблизи мембранного белка в небольших временных интервалах ($\leq 10^{-8}$ с) было определение подвижности спин-меченной жирной кислоты в реконструированной системе цитохромоксидаза — эндогенные митохондриальные фосфолипиды методом ЭПР. В дальнейшем подобные эксперименты проводились с использованием цитохромоксидазы и цитохрома b_5 и липидных бислоев, содержащих грамицидин А, а также мембраны микросом печени крысы, эритроцитов, вирусов Синдбис и везикулярного стоматита. Было показано, что значительная часть липидов в этих мембранах иммобилизована за счет белок-липидных взаимодействий. Количество иммобилизованных липидов при температурах 20—40 °C составляет примерно 0,2 мг на 1 мг белка (47 молекул фосфолипидов на белковый комплекс) цитохромоксидазы, что соответствует приблизительно одному слою липидов вокруг белковой глобулы. Примерно такое же количество (45—90) молекул иммобилизуется за счет взаимодействия с Ca^{2+} -АТФазой саркоплазматического ретикулума. Понижение температуры может приводить к возрастанию количества иммобилизованных липидов в 2—3 раза.

Существование участков липидного бислоя (аннулы липидов) с более плотной упаковкой и меньшей подвижностью углеводо-

родных цепей в модельных и природных биомембранах было показано также и с помощью других физико-химических методов (ЯМР, комбинационное рассеяние света, метод флуоресцентных зондов). Однако впоследствии концепция “пограничного липида” была подвергнута критике. Результаты, полученные с помощью метода ^2H -ЯМР, свидетельствуют о том, что пограничные липиды быстро обмениваются с основной массой липидов в бислое (скорость обмена весьма велика — 10^7 с^{-1}). Кроме того, в присутствии белков упорядоченность связанных липидов (т.е. транс-гош-конформации ацильных цепей) почти не изменяется, а скорость переориентации углеводородных цепей слабо уменьшается ($\approx$ на 20 %) в частотном диапазоне 10^9 с^{-1} . По данным ЯМР, трансмембранные белки весьма незначительно влияют на ориентацию и динамику липидных молекул и их полярных головок. Эти результаты были подтверждены и некоторыми другими методами, например, инфракрасной спектроскопией с фурье-преобразованием.

Противоречивые данные получены также при исследовании избирательности связывания белков с различными фосфолипидами. Так, селективность взаимодействия фосфолипидов, несущих определенные полярные группы, была выявлена для родопсина, Na^+ , K^+ -АТФазы из *Squalus acanthus*, цитохром-с-оксидазы, Ca^{2+} -АТФазы. Вместе с тем многочисленные эксперименты по реактивации выделенных мембранных ферментов путем добавления экзогенных липидов и детергентов показали, что в большинстве случаев не существует специфических белок-липидных взаимодействий, обеспечивающих ферментативную активность; разные типы липидов могут одинаково влиять на функционирование мембраносвязанных белков. Несмотря на то, что взаимодействие липидов с интегральными белками носит в основном гидрофобный характер, электростатические силы связывания заряженной гидрофильной части белковой молекулы и полярных групп окружающих липидов могут существенно влиять на характер липидного микроокружения белка. Кроме того, для активирующего действия липидов по отношению к некоторым мембранным ферментам важны такие факторы, как степень подвижности ацильных цепей и способность липидов образовывать мицеллы. По-видимому, сродство разных липидных молекул к белкам мембраны определяется не спецификой белков, а спецификой липидных молекул.

В последнее время внимание многих исследователей сосредоточено на изучении связывания с липидным бислоем периферических мембранных белков. Ряд периферических белков взаимодействует с мембраной путем связывания с интегральными белками. В то же время значительное количество белков связывается непосредственно с поверхностью липидного бислоя, причем некоторые из них способны к взаимодействию только в определенных условиях и на непродолжительное время. Иногда такое взаимодействие является необходимым условием проявления функциональной активности мембранного фермента (протеинкиназа С, пируватоксидаза, факторы свертывания крови).

По-видимому, типы взаимодействия между периферическими мембранными белками и фосфолипидным бислоем весьма разнообразны: связывание с участием амфифильных α -спиральных участков, электростатических сил, гидрофобных взаимодействий, ионов Ca^{2+} . Для изучения связывания периферических белков с фосфолипидами используют следующие методы: ЯМР, ИК-спектrophотометрию, люминесценцию, светорассеяние и др. В настоящее время активно исследуется роль процессов адсорбции и десорбции ферментов важнейших метаболических путей в регулировании их функциональной активности (раздел 2.3.2).

Белок-белковые взаимодействия в мембранах характеризуются высокой специфичностью и проявляются в виде обратимой внутримембранной агрегации мембранных белков, которая сопровождается изменением функциональной активности всей системы. При температурах ниже температуры фазовых переходов липидов белки находятся в агрегированном состоянии, а при температурах выше фазовых переходов — в диспергированном состоянии. Считают, что это происходит вследствие “выталкивания” белковых молекул из упорядоченной гелевой фазы. Степень диспергированности белков в мембране контролируется фазовым состоянием липидов. Имеются данные, свидетельствующие о том, что при частичном удалении липидов из мембраны происходит усиленная агрегация белков, а при введении в мембрану небольших количеств детергента наблюдается диссоциация олигомерных молекул, например, Ca^{2+} -АТФазы.

Степень агрегированности белков определяется несколькими факторами: энтропией смешивания “раствора” белков в липиде; прямыми белок-белковыми взаимодействиями, включающими ковалентные, водородные, солевые связи, электростатические и

дисперсионные силы притяжения, способствующие в целом образованию белковых агрегатов; равновесием в системе пограничный липид — общая липидная фаза с учетом количества молекул пограничных (аннулярных) липидов. Процессы агрегации — дезагрегации мембранных белков проявляются при пиноцитозе, взаимодействии и слиянии мембран, на разных стадиях клеточного цикла.

Необходимо подчеркнуть, что для интегральных белков мембран, по-видимому, характерно формирование иммобилизованного кольца (аннулы) пограничных липидов с нарушенной упаковкой ацильных цепей, контактирующих с гидрофобной частью молекулы белка. Однако комплекс белка с пограничным липидом представляет собой динамическое образование, время существования которого исчисляется микросекундами. Липидное кольцо является более “твердым” по сравнению с остальной частью бислоя, если последний находится в жидком состоянии, но более “жидкое”, если бислоем находится в гелеобразном состоянии. По всей вероятности, состав и фазовое состояние (а именно жидкокристаллическое) липидов аннулы важны, прежде всего, для функционирования мембранных белков-ферментов.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Дайте характеристику основных групп липидов мембран про- и эукариотических организмов.
2. Какие особенности структуры мембранных липидов обеспечивают выполнение ими различных функций?
3. Опишите основные свойства липидов биомембран и типы связей между ними.
4. Что представляют собой фазовое состояние и фазовые переходы липидов в мембране? Какие факторы влияют на фазовое состояние мембранных липидов?
5. Обоснуйте утверждение: “Фазовые переходы липидов обуславливают функциональное состояние мембраны”.
6. Что такое аннулярные липиды, в чем состоят особенности их структурно-функционального состояния и значение для функционирования мембран?
7. На какие группы подразделяют мембранные белки?
8. Каковы особенности строения молекул интегральных белков мембран в связи с выполняемыми ими функциями?
9. Что такое асимметрия компонентов мембран, каковы ее причины и значение для нормального функционирования биомембран?

10. Какова роль периферических белков в стабилизации биомембран?

11. Какие функции выполняют мембранные АТФазы? Раскройте механизм функционирования Na^+ , K^+ -АТФазы плазматических мембран.

12. Каковы особенности структуры мембранных углеводов в связи с выполняемыми ими функциями?

13. Что представляют собой белок-липидные взаимодействия в мембранах? Какие типы связей участвуют в их поддержании?

14. Используя материал главы 1 и приложения, опишите строение и функции эритроцитарных мембран.

15. Что понимают под терминами “кинки” и “динамические дефекты”, какова их роль в функционировании биомембран?

16. Используя материал глав 1 и 5 (раздел 5.1), опишите методы (с указанием их принципов, достоинств и недостатков), которые используются для:

- а) изучения белок-липидных взаимодействий в мембранах;
- б) изучения фазовых переходов в липидном бислое;
- в) исследования особенностей конформационного состояния мембранных белков.

17. Какова роль мембранных липидов в осуществлении важнейших метаболических процессов в клетке?

Глава 2

УЧАСТИЕ КОМПОНЕНТОВ БИОМЕМБРАН В ОСУЩЕСТВЛЕНИИ И РЕГУЛИРОВАНИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

В настоящее время не вызывает сомнений тот факт, что биологические мембраны играют ключевую роль в процессах приема, переработки и передачи информации в клетке, обеспечивающих согласованное протекание множества биохимических реакций целостного организма. Изучение молекулярных механизмов регуляции клеточного метаболизма с помощью внешних (первичных) и внутриклеточных (вторичных) сигналов (проблемы клеточной сигнализации) является предметом пристального внимания биофизиков, биохимиков, молекулярных биологов, иммунологов. Эта стремительно развивающаяся область мембранологии как комплексной научной дисциплины начала развиваться во второй половине XX века после открытия Е. Сазерлендом (Нобелевский лауреат, 1971) циклического аденозин-3,5-монофосфата (сАМФ) и создания концепции вторичных сигналов (мессенджеров). Рассмотрим более подробно основные принципы функционирования систем получения и переработки информации в клетке.

2.1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕССОВ ПЕРЕДАЧИ ИНФОРМАЦИИ В КЛЕТКЕ

Внешний сигнальный агент, называемый *первичным мессенджером*, как правило, не проникает внутрь клетки, а специфически взаимодействует с рецепторами наружной клеточной мембраны. В качестве первичных мессенджеров выступают различные химические соединения (гормоны, нейромедиаторы) или физические факторы (квант света). Однако гидрофобные стероидные и тиреоидные гормоны способны диффундировать через липидный бислой внутрь клетки и связываться с растворимыми рецепторными белками. Если внешняя сигнальная молекула воздействует на рецепторы клеточной мембраны и активирует их, то последние передают полученную информацию на систему белковых компонентов мембраны, называемую каскадом передачи сигнала. Мембранные белки каскада передачи сигнала подразделяют на белки-преобразователи, связанные с рецепторами, и ферменты-усилители, связанные с белками-преобразователями и активирующие вторичные внутриклеточные мессенджеры, перено-

сящие информацию внутрь клетки. В роли *вторичных мессенджеров* выступают малые молекулы и ионы: сАМР, циклический гуанозин-3,5-монофосфат (сGMP), инозитол-1,4,5-трифосфат (IP₃), диацилглицерол (DG), арахидоновая кислота, ионы кальция. Вторичные мессенджеры характеризуются следующими свойствами: имеют небольшую молекулярную массу и с высокой скоростью диффундируют в цитоплазме; быстро расщепляются и быстро удаляются из цитоплазмы (например, ионы кальция выкачиваются во внешнюю среду или поступают во внутриклеточные депо с помощью Ca²⁺-АТФаз). В противном случае система передачи информации будет функционировать в отсутствие первичного мессенджера, что приведет к нарушению протекания метаболических реакций в клетке и возникновению патологических состояний организма. Таким образом, процесс передачи внешнего сигнала с помощью внутримембранных компонентов каскада представляет собой совокупность последовательных стадий изменения конформационного состояния и функциональной активности белков, связанных друг с другом непосредственно или опосредованно с участием других структурных элементов мембран.

2.1.1. Особенности структуры и функций мембранных рецепторов

В плазматических мембранах про- и эукариотических клеток локализованы различные специализированные рецепторные системы, процессы функционирования которых включают реализацию следующих стадий:

- связывание первичного мессенджера с рецептором;
- передачу информации о связывании внешнего сигнала с рецептором на мембранные белковые компоненты каскада;
- формирование первичного и вторичного клеточного ответа.

Обнаружены суперсемейства рецепторных белков со сходной первичной структурой, но различными функциями, взаимодействующих с определенным типом лигандов и вызывающих развите специфического клеточного ответа (табл. 8).

Большинство рецепторов представлены олигомерными мембранными белками – гликопротеинами. Функции рецепторов могут выполнять и мембранные ганглиозиды. Взаимодействие рецепторов с лигандами специфично: молекулы — инициаторы трансмембранной передачи сигнала активируют рецепторы, воздействуя на последние в концентрациях 10⁻⁸ моль/л и менее.

*Некоторые суперсемейства структурно родственных
рецепторов мембран эукариот*

№ п/п	Суперсемейство рецепторов	Функции
1	Иммуноглобулиновое суперсемейство: Т-клеточный рецептор Главный комплекс гистосовместимости класса II IgA/IgM-рецепторы Поверхностные иммуноглобулины	Развитие иммуно- логических реакций
2	Интегрины: Фибронектиновые рецепторы Гликопротеиновый комплекс тромбоцитов Лейкоцитарные белки адгезии	Связывание с компо- нентами внекле- точного матрикса и белками адгезии
3	Рецепторы митогенов факторов роста , обладающие тирозинкиназной актив- ностью: Рецептор фактора роста эпидермиса Рецептор фактора роста производных тромбоцитов Инсулиновый рецептор	Стимуляция клеточного роста
4	Рецепторы нейромедиаторов ионные ка- налы : Никотиновый ацетилхолиновый рецептор Рецептор γ -аминомасляной кислоты Глициновый рецептор	Каналы, функционирующие как рецепторы
5	Рецепторы, активирующие G-белки: β -Адренергические рецепторы α -Адренергические рецепторы Опсины родопсин Мускариновые ацетилхолиновые рецепторы	Участвуют в активации G-белков

Для обеспечения рецепторной функции молекулы белков долж-
жны отвечать ряду требований:

- а) обладать высокой избирательностью к лиганду;
- б) кинетика связывания лиганда должна описываться кривой с насыщением, соответствующим состоянию полной занятости всех молекул рецепторов, число которых на мембране ограничено;
- в) рецепторы должны обладать тканевой специфичностью, отражающей наличие или отсутствие данных функций в клетках органа-мишени;
- г) связывание лиганда и его клеточный (физиологический) эффект должны быть обратимы, параметры сродства должны соответствовать физиологическим концентрациям лиганда.

Лиганд-рецепторные взаимодействия реализуются при помощи слабых нековалентных сил: электростатических, ион-дипольных, ван-дер-ваальсовых и гидрофобных взаимодействий, водородных связей.

Рассмотрим основные свойства рецепторов плазматической мембраны клетки и формирование первичного ответа.

1. Рецепторы, сопряженные с G-белками

Эти рецепторы образуют комплекс с мембранными GTP-связывающими белками (G-белками). Первичными сигналами для этих рецепторов служат низкомолекулярные гормоны и нейротрансмиттеры (адреналин, норадреналин, ацетилхолин, серотонин, гистамин), пептидные и белковые гормоны (адренокортикотропный гормон, соматостатин, вазопрессин, гонадотропные гормоны). Один и тот же первичный мессенджер может инициировать передачу сигнала с участием последовательности разных рецепторов G-белков. Эти рецепторы представляют собой мономерные интегральные мембранные белки, полипептидная цепь которых семь раз пересекает клеточную мембрану. При связывании лиганда с рецептором изменяется конформационное состояние комплекса рецептор G-белка — G-белок. В результате облегчается обмен связанного с G-белком GDP на GTP (рис. 15). Активиро-

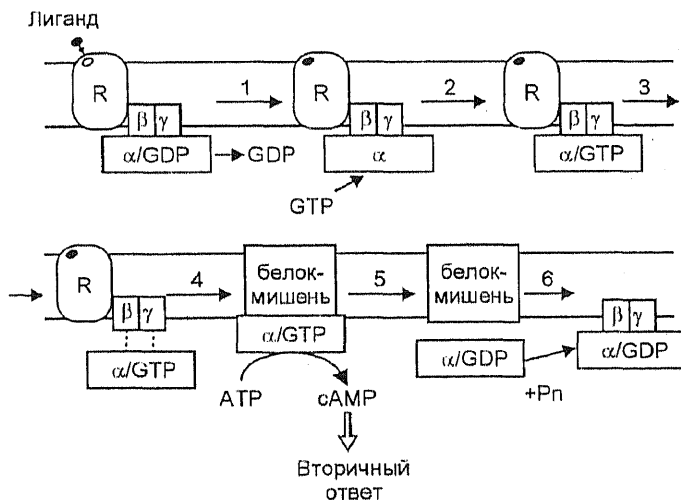


Рис. 15. Схема эффектов, индуцируемых присоединением лиганда к рецептору (R), сопряженному с G-белком (развитие первичного ответа)

ванный таким образом G-белок, связанный с GTP, может отделиться от рецептора, а его субъединица α взаимодействует в результате этого с мембранными белками — мишенями (аденилатциклазой, ионными каналами, фосфолипазой C).

Обнаружено около 20 типов различных G-белков*. Они являются гетеротримерами, которые состоят из субъединиц трех типов: α , β , γ . В норме две последние субъединицы функционируют как единый $\beta\gamma$ -комплекс. На α -субъединице локализован центр связывания гуаниловых нуклеотидов. В табл. 9 представлены характеристики некоторых G-белков.

Все G-белки прочно связаны с плазматическими мембранами, за исключением трансдуцина, который *in vitro* легко отсоединяется от мембраны. Ни одна из субъединиц не является трансмембранным белком. Однако α -субъединица может быть ацилирована и присоединяется к мембране с помощью ковалентно связанной жирной кислоты.

При переходе сигнала в каскаде: рецептор $\rightarrow$ G-белок $\rightarrow$ эффекторный белок исходный внешний сигнал способен к многократному усилению (амплификации). Это связано с тем, что одна молекула рецептора, находясь в активированном состоянии в результате присоединения лиганда, переводит в активированную форму несколько молекул G-белка. При этом коэффициент усиления внешнего сигнала может составлять 10^2 — 10^3 , так как на каждую молекулу рецептора приходится несколько сотен или тысяч образующихся молекул G-белка. На следующей стадии каскада (G-белок $\rightarrow$ эффекторный белок) каждая молекула активированного G-белка взаимодействует только с одной молекулой эффекторного белка, но в ответ на это в цитоплазме образуется (распадается) большое количество молекул вторичного мессенджера. В результате суммирования процессов амплификации внешнего сигнала в каскаде: рецептор $\rightarrow$ G-белок $\rightarrow$ эффекторный белок коэффициент усиления может составлять 10^5 — 10^6 .

“Выключение” каскада передачи внешнего сигнала осуществляется различными способами: путем диссоциации сигнальной молекулы из комплекса с рецептором; путем фосфорилирования рецепторов с участием протеинкиназ; в результате гид-

* За открытие G-белков и изучение их роли в трансдукции сигнала в клетке А. Гилману и М. Родбеллу в 1994 г. присуждена Нобелевская премия.

Таблица 9

Свойства и функции некоторых G-белков

G-белок	Рецепторный белок (белки)	Белок (белки)-мишень	Функция	Молекулярная масса субъединиц, кДа			Чувствительность к токсину
				α	β	γ	
Gs (очищен до гомогенного состояния)	β -Адренергические рецепторы (β_1 и β_2)	Аденилатциклаза	Стимуляция	45—52	35—36	8	Холерный токсин
Gi (очищен до гомогенного состояния)	α -Адренергический рецептор Мускариновый холинергический рецептор A_1 -аденозиновый рецептор D_2 -дофаминовый рецептор Опиатный рецептор	Аденилатциклаза	Ингибирование	41	35—36	8	Коклюшный токсин
Gt (трансдуцин, очищен до гомогенного состояния)	Родопсин	cGMP-специфичная фосфодиэстераза Фосфолипаза A_2	Стимуляция	39	36	8	Коклюшный и холерный токсины
Go (очищен до гомогенного состояния)	Опиатный рецептор (мозг)	Потенциалзависимый Ca^{2+} -канал	Закрывание канала	39	35—36	8	Коклюшный токсин (?)
Gp	Мускариновый холинергический рецептор Вазопрессинный рецептор Ангиотензивный рецептор IgE-рецептор с высоким сродством	Фосфатидилинозитолспецифичная фосфолипаза C	Стимуляция	—			—
Gk	Мускариновый холинергический рецептор Дофаминовый рецептор Гистаминовый рецептор	K^+ -канал (?)	Открывание канала	—			?

ролиза связанного с G-белками GTP до GDP, а также восстановления исходного уровня внутриклеточного вторичного мессенджера в цитоплазме.

2. Ионные каналы, функционирующие как рецепторы

Они представляют собой интегральные мембранные белки, полипептидные цепи которых несколько раз пронизывают липидный бислой. Связывание агониста с рецептором приводит к открыванию канала и селективному изменению ионной проницаемости мембраны. К таким рецепторам — ионным каналам относят лигандуправляемые ионные каналы, являющиеся рецепторами нейротрансмиттеров (см. табл. 8).

Наиболее глубоко изучены никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (холинорецепторы) в скелетных мышцах и электрических органах ската и угря. Холинорецептор состоит из четырех гликозилированных субъединиц α (50 кДа), β (54 кДа), γ (56 кДа) и δ (58 кДа) с молярным соотношением 2:1:1:1, имеет “грибовидную” форму и ориентирован перпендикулярно поверхности мембраны. Катионный канал холинорецептора открывается при взаимодействии двух молекул агониста (ацетилхолин, карбамилхолин, суберилхолин) с участками связывания двух α -субъединиц рецептора. Малоселективные катионные каналы никотинового ацетилхолинового рецептора непроницаемы для ионов.

3. Рецепторы, обладающие ферментативной активностью

Представляют собой моно- или олигомерные белки, имеющие центр связывания первичного мессенджера, локализованный на внешней поверхности мембраны. На внутреннюю (цитоплазматическую) сторону мембраны обращен каталитический участок, активируемый в результате воздействия на молекулу рецептора внешнего сигнала. К рецепторам, обладающим ферментативной активностью, относят рецепторные протеинкиназы, способные аутофосфорилироваться и фосфорилировать белки-мишени по тирозиновым остаткам, а также протеинтирозинфосфатазы, дефосфорилирующие фосфотирозиновые остатки белков-мишеней. Они участвуют в регулировании процессов деления клетки, их дифференцировании, развитии иммунного ответа. Рецепторные гуанилатциклазы, катализирующие синтез cGMP из GTP, необходимы для регуляции водно-солевого обмена и тонуса сосудов.

Развитие вторичного (клеточного) ответа в результате функционирования компонентов каскада передачи внешнего сигнала реализуется на разных уровнях: транскрипции, трансляции и на уровне изменения структурно-функционального состояния ключевых внутриклеточных белков. Последний механизм включает обратимую ковалентную модификацию белков (фосфорилирова-

ние, метилирование, ацилирование), изменение функциональных свойств белков непосредственно или опосредованно под действием вторичных мессенджеров, модуляцию свойств олигомерных белков посредством ассоциации — диссоциации субъединиц, обратимые переходы белков из свободного состояния в связанное (изменение компартментализации)*. Более подробно некоторые из вышеназванных способов регулирования метаболических процессов описаны в разделе 2.3.

2.1.2. Аденилатциклазный путь передачи сигнала

Наиболее полно охарактеризованы два основных пути передачи информации в клетке, которые различаются природой и свойствами вторичных мессенджеров. В аденилатциклазном пути в качестве внутриклеточного посредника выступает циклический аденозинмонофосфат. В фосфоинозитидном пути действует группа мессенджеров: ионы кальция и образующиеся из мембранных фосфолипидов инозитолтрифосфат и диацилглицерол.

Схема аденилатциклазного пути передачи информации в клетке представлена на рис. 16.

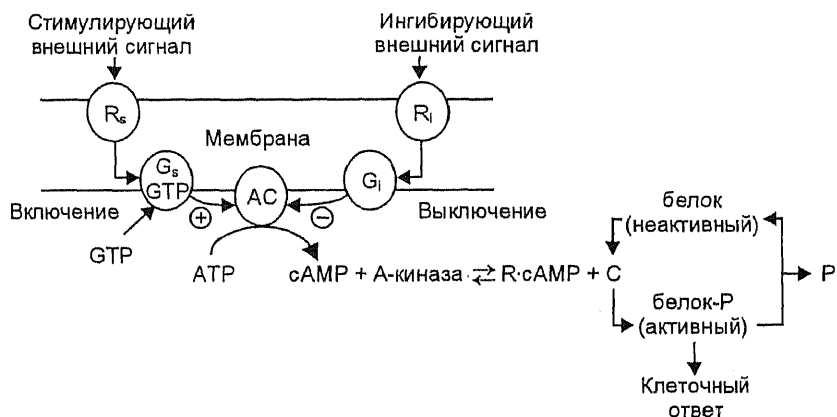


Рис. 16. Аденилатциклазный путь передачи информации: R_s и R_i — соответственно стимулирующие и ингибирующие рецепторы; G_s и G_i — соответственно стимулирующие и ингибирующие G-белки; AC — аденилатциклаза; A-киназа — протеинкиназа A; R и C — регуляторная и каталитическая субъединицы протеинкиназы A

* За открытие обратимого фосфорилирования белков как биологического регуляторного механизма Э. Фишеру и Э. Кребсу в 1992 г. присуждена Нобелевская премия.

Стимулирующие Gs-белки взаимодействуют со стимулирующими рецепторами G-белков (Rs), а ингибирующие Gi-белки — с ингибирующими рецепторами (Ri). Связывание внешней сигнальной молекулы с рецептором индуцирует конформационные изменения последнего, которые передаются на G-белки. В ответ на это G-белок приобретает способность присоединять GTP и воздействовать на функциональную активность аденилатциклазы (т.е. “усилительного” фермента). Gs-белок активирует аденилатциклазу, а Gi-белок ингибирует ее (см. табл. 9). Активность комплекса Gs-GTP подавляется в результате гидролиза GTP до GDP, катализируемого гуанозинтрифосфатазой. Ингибирование этого фермента холерным токсином приводит к увеличению времени жизни комплекса G-белок — GTP. Клетка начинает вырабатывать сАМР независимо от действия внешнего сигнала. В клетках кишечника сАМР вызывает сильную секрецию жидкости, что приводит к тяжелой диарее, которой страдают больные холерой.

Конечные стадии передачи сигнала осуществляются с участием сАМР-зависимых протеинкиназ (А-киназ). сАМР специфически связывается с регуляторной субъединицей протеинкиназы. Это приводит к активации каталитической субъединицы белка и ее отделению от регуляторной. Каталитическая субъединица в свободном состоянии может фосфорилировать определенный белок, активация которого и обуславливает ответ клетки на воздействие внешнего сигнала.

2.1.3. Фосфоинозитидный путь передачи информации

В этом механизме передачи сигнала в клетку активное участие принимают мембранные фосфолипиды, в частности, фосфатидилинозитол, на долю которого приходится от 2 до 8 % фосфолипидов клеточных мембран.

Внешний сигнал после взаимодействия с рецептором активирует Gp-белок (рис. 17), а затем — “усилительный” фермент — фосфодиэстеразу (фосфолипазу C), которая расщепляет фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат (PIP_2) на водорастворимый инозитол-1,4,5-трифосфат (IP_3) и липидорастворимый диацилглицерол (DG). Инозитолтрифосфат и диацилглицерол являются вторичными мессенджерами. Гидрофильный инозитолтрифосфат диффундирует в цитоплазму и вызывает освобождение ионов Ca^{2+} из внутриклеточных депо (эндоплазматический ретикулум,

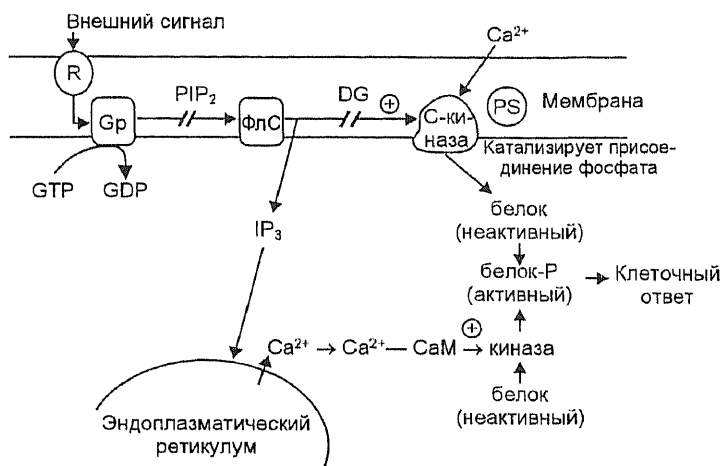


Рис. 17. Фосфоинозитидный путь передачи сигнала: PIP_2 — фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат; ФлС — фосфолипаза С; IP_3 — инозитол-1,4,5-трифосфат; DG — диацилглицерол; С-киназа — протеинкиназа С; PS — фосфатидилсерин; СаМ — кальмодулин

митохондрии). Ионы кальция образуют комплекс с Ca^{2+} -связывающим белком кальмодулином (СаМ), активирующим киназу, катализирующую фосфорилирование неактивного белка. Активация фосфорилированного белка обуславливает развитие клеточного ответа.

Оставшийся в мембране диацилглицерол активирует протеинкиназу С (С-киназу). Протеинкиназа С в присутствии кислого фосфолипида — фосфатидилсерина и ионов кальция катализирует присоединение фосфата к неактивному белку. В результате фосфорилирования белка развивается ответная реакция клетки.

Диацилглицерол может подвергаться дальнейшим превращениям. Диацилглицеролкиназа в присутствии АТФ фосфорилирует диацилглицерол с образованием фосфатидной кислоты. Предполагают, что последняя способна выполнять роль ионофора (подвижного переносчика) для ионов кальция. При переносе этих ионов через плазматическую мембрану образуются участки с небислоидной структурой, т.е. каналы для проникновения ионов Ca^{2+} . Кроме того, под действием диацилглицероллипазы из диацилглицерола образуется арахидоновая кислота, окисляющаяся затем до биологически активных метаболитов — эйкозаноидов, которые сами являются эффективными модуляторами разнообраз-

ных реакций в клетке. Фосфоинозитиды регулируют процессы деления клеток, секреции гормонов, транспорта ионов.

Структурные аналоги диацилглицерола — фоболовые эфиры — способствуют развитию злокачественных опухолей. Они имитируют действие диацилглицерола и обеспечивают передачу пролиферативного сигнала, однако в организме не расщепляются. Вследствие этого каскад передачи сигнала функционирует непрерывно и способствует активации процессов клеточного деления. Изучение действия токсинов и химических агентов, специфически взаимодействующих с компонентами системы передачи сигнала, необходимо для выявления молекулярных механизмов внутриклеточной сигнализации, а также развития патологических состояний организма человека.

Необходимо отметить, что вышеописанные механизмы передачи информации имеют много общих черт и включают реализацию трех основных этапов:

- взаимодействие рецептора с первичным мессенджером;
- изменение конформации и функциональных свойств мембранных белков-посредников (белка-“преобразователя” и фермента-“усилителя”);
- активацию вторичных мессенджеров, взаимодействие которых с определенными структурными компонентами клетки индуцирует быстрое распространение сигнала по всей клетке.

2.2. РОЛЬ ИОНОВ В ОСУЩЕСТВЛЕНИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ С УЧАСТИЕМ МЕМБРАН

Ионная регуляция является одним из важных механизмов управления внутриклеточными процессами. Изменения ионной силы или ионного состава в клетке влияют на агрегатное состояние и характер движения протоплазмы, функциональное состояние органелл, конформацию и взаимодействие биомакромолекул, изменяют активность и специфичность ферментов и мультиферментных систем и т.д. В осуществлении и регулировании различных метаболических процессов в клетке активное участие принимают, прежде всего, ионы металлов. Одновалентные катионы участвуют в регуляции внутриклеточного pH, являются кофакторами многих ферментов, обеспечивают электрические свойства мембран клеток. Установлено, что они контролируют активность и специфичность более 100 ферментов. Большинство

белков активируется калием; функциональная активность некоторых подавляется натрием. Например, гликолитические ферменты стимулируются ионами калия цитоплазмы. Экспериментальные данные, свидетельствующие о взаимосвязи активного транспорта одновалентных катионов с уровнем клеточного дыхания, легли в основу создания концепций ионной регуляции температуры тела теплокровных животных, согласно которым скорость метаболических процессов и соответственно теплопродукции регулируется концентрацией ионов в клетках и среде.

Ионы Na^+ и K^+ широко распространены в неживой природе. В клетке эти ионы распределены неравномерно: ионы натрия выбрасываются из клетки, ионы калия накапливаются в ней. В результате создается разность концентраций одновалентных ионов на клеточной мембране, необходимая для генерации возбуждения в нервных и мышечных клетках. Первично-активный транспорт ионов, осуществляющийся с использованием энергии АТФ или окислительно-восстановительных реакций, происходит с участием транспортных АТФаз (см. раздел 1.2.4). Однако градиент концентрации одновалентных ионов необходим и для функционирования систем вторично-активного транспорта (в том числе сахаров и аминокислот). В клетке ионы калия являются активаторами многих ферментативных процессов, таких как синтез ацетилхолина, синтез белка на рибосомах, дыхание митохондрий, ДНК-полимеразная и РНК-полимеразная реакции, фосфофруктокиназная реакция.

В противоположность ионам калия ионы натрия активируют лишь синтез липидов и являются ингибиторами многих клеточных реакций. Кроме того, одновалентные катионы участвуют в регулировании осмотического баланса организма, а также модифицируют конформационное состояние молекул белков и нуклеиновых кислот.

Важную роль в жизнедеятельности клетки играют двухвалентные катионы Ca^{2+} и Mg^{2+} .

Ионы кальция представляют собой единственный универсальный вторичный мессенджер животных и растительных клеток. Различают три состояния кальция в клетке:

- Ca^{2+} , локализованный внутри клеточных органелл (эндоплазматического ретикулума, митохондрий);

- хелатированный кальций, связанный с анионами и белками цитозоля;

— свободный или ионизированный Ca^{2+} , находящийся в равновесии с хелатированным кальцием.

Внутриклеточные процессы регулирует свободный или ионизированный кальций. В состоянии покоя концентрация кальция в цитоплазме поддерживается на уровне 10^{-6} — 10^{-7} моль/л. Низкий уровень этих ионов в состоянии покоя связан с функционированием специализированных мембранных систем: Ca^{2+} -АТФазы плазматических мембран, выкачивающей Ca^{2+} против концентрационного градиента из клетки во внешнюю среду; $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника, осуществляющего в зависимости от условий обмен внутриклеточного Ca^{2+} на внеклеточный Na^+ ; Ca^{2+} -АТФазы мембран эндоплазматического ретикулума, откачивающей кальций из цитоплазмы и накапливающей его внутри замкнутых цистерн ретикулума; транспортной системы митохондриальных мембран, перекачивающей Ca^{2+} из цитоплазмы в матрикс митохондрий (рис. 18).

Стимуляция клетки путем воздействия гормонов на специфические рецепторы плазматической мембраны и активация вторичных мессенджеров приводит к резкому кратковременному увеличению концентрации Ca^{2+} в клетке до 10^{-5} моль/л. Ионы кальция взаимодействуют с особыми кальцийсвязывающими белками и тем самым влияют на разнообразные метаболические процессы. К таким белкам относят кальмодулин, тропонин С сердечных и скелетных мышц, кальбиндин кишечника, кальретибин нейронов, онкомодулин плаценты и опухолей и др.

Ca^{2+} -связывающие белки регулируют в клетке транспорт кальция, активируют ферменты, регулируют состояние цитоскелета клетки и клеточный цикл, способны контролировать процессы транскрипции и апоптоз (программируемую гибель клетки). Ca^{2+} -связывающие белки, секретированные во внеклеточное пространство, могут выступать в качестве факторов роста, влияют на хемотаксисы, взаимодействуют с компонентами внеклеточного матрикса.

В эритроцитах действие ионов Ca^{2+} опосредуется кальмодулином. Наиболее вероятными мишенями для кальмодулина среди белков цитоскелета эритроцита являются спектрин, белок полосы 4.1, аддуцин (белок цитоскелета, обеспечивающий взаимодействие спектрина с актином). Кальмодулин ингибирует взаимодействие в цепи спектрин — актин — белок полосы 4.1. Увеличение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме приводит к изменению формы, снижению деформабильности, уменьшению продолжи-

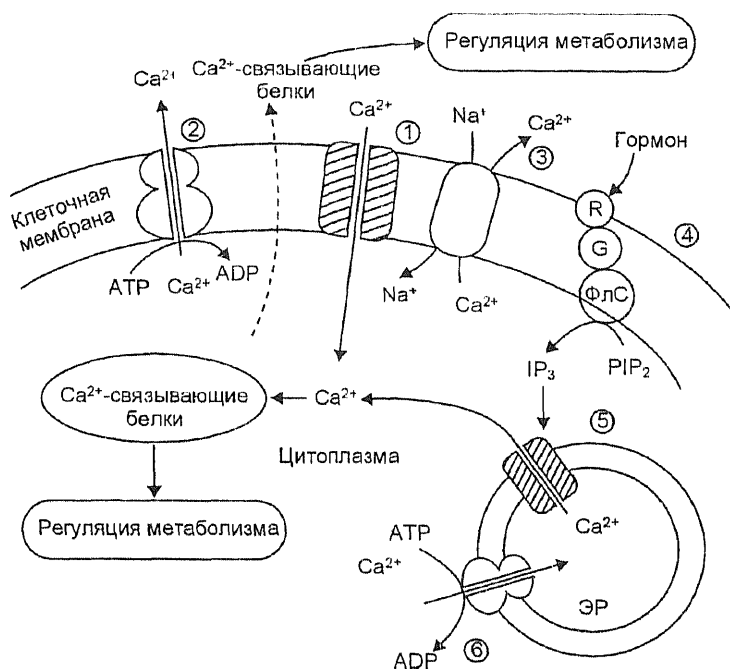


Рис. 18. Схематическое изображение некоторых мембранных систем клетки, участвующих в транспорте ионов Ca^{2+} : 1 — Ca^{2+} -каналы плазматической мембраны; 2 — Ca^{2+} -АТФаза плазматической мембраны; 3 — $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник; 4 — фосфоинозитидный путь передачи информации в клетку (R — рецептор, G — G-белок, ФлС — фосфолипаза С, PIP_2 — фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат; IP_3 — инозитол-1,4,5-трифосфат); 5 — Ca^{2+} -каналы эндоплазматического ретикулума (ЭР); 6 — Ca^{2+} -АТФаза эндоплазматического ретикулума

тельности жизни эритроцитов. Кальций и кальмодулин вызывают обратимое снижение стабильности мембран эритроцитов. Инкубация эритроцитов с подвижными переносчиками (ионофорами) Ca^{2+} при миллимолярных его концентрациях индуцирует сфероцитоз и уменьшение площади клеточной поверхности. Концентрация Ca^{2+} в эритроцитах определяется балансом между его активным транспортом из цитоплазмы в плазму крови и пассивным потоком в обратном направлении, который лимитируется активностью рецептор- и потенциалуправляемых кальциевых каналов мембраны. Следовательно, в клетке осуществляется тесная взаимосвязь между состоянием мембранного скелета, уров-

нем протекания метаболических процессов и функционированием систем пассивного и активного транспорта.

Ионы Mg^{2+} способны модифицировать конформационное состояние молекул белков, выступать в качестве субстратсвязывающих ионов и переносчиков электронов. Mg^{2+} необходим в качестве кофактора для более чем сотни ферментов, входит в состав фотосинтетического пигмента растительных клеток — хлорофилла.

В табл. 10 приведена сравнительная характеристика концентраций ионов внутри и снаружи типичной животной клетки. Анализ приведенных в ней данных дает возможность констатировать, что значительные различия в ионном составе цитозоля и внеклеточной жидкости позволяют клеточным мембранам аккумулировать потенциальную энергию в виде градиентов концентраций ионов, используемую для осуществления различных процессов клеточного метаболизма.

Т а б л и ц а 10

Концентрации ионов внутри и снаружи животной клетки

Компонент	Внутриклеточная концентрация, ммоль	Внеклеточная концентрация, ммоль
Катионы:		
Na ⁺	5—15	145
K ⁺	140	5
Mg ²⁺	0,5	1—2
Ca ⁺	10 ⁻⁴	1—2
H ⁺	8·10 ⁻⁵ 10 ^{-7,1} моль или pH 7,1	4·10 ⁻⁵ 10 ^{-7,4} моль или pH 7,4)
Анионы:		
Cl ⁻	5—15	110

2.3. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИНТЕГРАЦИИ КЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА

2.3.1. Механизмы регулирования функциональной активности ферментов и ферментных систем в клетке

Биомембраны не только представляют собой места локализации многих важнейших ферментов и ферментных систем клетки, но и принимают непосредственное участие в их осуществлении и регулировании. Р. Б. Геннисом (1997) предложена условная классификация типов ферментов, функционирование которых тесно связано с мембранами:

1. Трансмембранные ферменты, катализирующие сопряженные реакции на противоположных сторонах мембраны. Они имеют несколько активных центров, сопряжение между которыми осуществляется с помощью потока электронов, генерирующих трансмембранный электрический потенциал. К ним относятся фотосинтетические реакционные центры растений и бактерий, цитохром С-оксидаза митохондрий, рецепторы, обладающие протеинкиназной активностью.

2. Трансмембранные ферменты, участвующие в транспорте веществ. Это транспортные АТФазы, охарактеризованные в главе 1.

3. Белки, являющиеся компонентами электронтранспортных цепей. Наиболее типичные ферменты этого класса — компоненты дыхательной цепи митохондрий, ферменты системы электронного транспорта микросом, элементы фотосинтетической электронтранспортной цепи в тилакоидах (в частности, различные цитохромы). Остается открытым вопрос об образовании устойчивых комплексов ферментов названных структур и длительности их жизни.

4. Ферменты, способные использовать мембраносвязанные субстраты. Это ферменты, участвующие в метаболизме компонентов мембран: фосфолипидов, гликолипидов, стероидов; в процессинге мембранных и секреторных белков; их примером являются различные фосфолипазы.

5. Ферменты, использующие водорастворимые субстраты. Так, ацетилхолинэстераза, катализирующая гидролиз ацетилхолина, фиксируется, по-видимому, в постсинаптической мембране с помощью ковалентной сшивки с фосфатидилинозитольным гликолипидом.

6. Ферменты, способные образовывать мембраносвязанный комплекс. Мембрана при этом служит своеобразным организующим каркасом, с которым связываются периферические ферменты с образованием мультиферментного комплекса. Это ферменты гликолиза и цикла трикарбоновых кислот.

7. Ферменты, совершающие челночные перемещения между цитозолем и мембраной, активность которых модулируется путем связывания с мембраной. Такие ферменты способны взаимодействовать либо с поверхностью фосфолипидного бислоя, либо со специфическими белковыми рецепторами. К ним следует отнести пируватоксидазу из *E. coli*, протеинкиназу С, некоторые ферменты каскада свертывания крови.

В целом механизмы регулирования функциональной активности ферментов и ферментных систем клетки подразделяют на две группы (Б. И. Курганов, 1986): регуляторные механизмы, направленные на поддержание концентраций ключевых метаболитов на постоянном уровне (механизмы поддержания клеточного гомеостаза), и регуляторные механизмы “слежения” (“мониторинга”) за сигналами, поступающими от нервной, гормональной и иммунной систем, реализующиеся с участием вторичных посредников (рис. 19). Механизмы поддержания гомеостаза и “слежения” за состоянием биосистем реализуются на различных уровнях их организации. В частности, механизмы “слежения” занимают более высокое положение в иерархической системе уровней контроля клеточного метаболизма по сравнению с механизмами поддержания гомеостаза.

Для низкомолекулярных катализаторов основными механизмами контроля являются механизмы *изостерической регуляции*, реализующиеся в результате прямого воздействия модификатора. При переходе к высокомолекулярным катализаторам возможность осуществления изостерических механизмов сохраняется. Однако в действии модификаторов изостерического типа (например, конкурент-

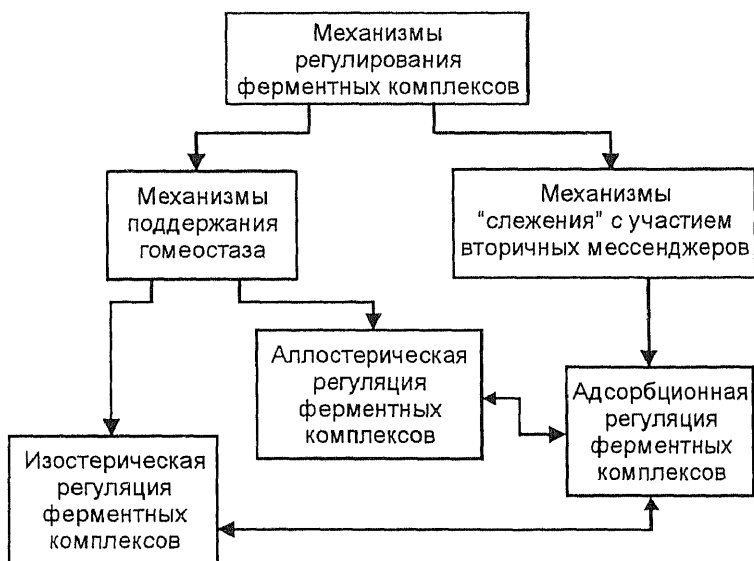


Рис. 19. Схема механизмов регулирования активности ферментов и ферментных систем в клетке

ных ингибиторов) появляется аллостерическая составляющая в том случае, если фермент олигомерный и имеет несколько активных центров. Модификатор, связывающийся в районе активного центра, действует как модификатор изостерического типа на уровне субъединицы и при этом может по аллостерическому механизму влиять на функционирование активных центров, локализованных на других субъединицах фермента (т.е. действует как аллостерический эффектор на уровне ферментного олигомера).

Механизм *аллостерического регулирования* процесса функционирования ферментов обеспечивается узнаванием и связыванием метаболита-регулятора в аллостерическом центре. В результате происходит изменение конформационного состояния и каталитических свойств активного центра белковой молекулы. Конечный этап заключается в воздействии по принципу обратной связи на источник возникновения регулирующего сигнала: изменение скорости образования продуктов ферментативной реакции, поступающих в цепь последовательных метаболических реакций, приводит к изменению функционирования фермента, продуцирующего метаболит-регулятор.

Адсорбционный механизм регулирования активности ферментов и ферментных комплексов реализуется при соблюдении следующих условий:

- существует обратимое равновесие между свободной формой фермента и адсорбированным ферментом;
- каталитические характеристики фермента изменяются при его адсорбции;
- обратимое равновесие между свободной и связанной формами фермента является чувствительным к воздействию клеточных метаболитов.

Физиологическая важность обратимого связывания ферментов субклеточными структурами рассматривается в следующих аспектах:

- адсорбция ферментов может приводить к изменению их каталитических и регуляторных свойств и, следовательно, является фактором, регулирующим активность ферментов;
- адсорбция ферментов может обеспечивать компартментализацию метаболитов у поверхности, на которой адсорбированы эти ферменты;
- адсорбированные ферменты способны образовывать упорядоченные мультимерные структуры (метабоны), благо-

даря чему появляется возможность регулировать метаболический процесс как единое целое;

— ферменты, адсорбированные на белковых порах мембран, могут участвовать в активном транспорте метаболитов через мембрану;

— адсорбированные ферменты более стабильны, чем свободные ферменты. Таким образом, адсорбция может служить фактором, снижающим скорость деградации ферментов в клетке.

Рассмотрим адсорбционный механизм регулирования функциональной активности ферментов важнейших метаболических путей более подробно, так как он реализуется с участием различных мембранных структур клетки.

2.3.2. Адсорбционный механизм регуляции метаболизма: понятие о метаболоне, его структура, физиологическое значение образования

В последние годы наряду с “классической” энзимологией, рассматривающей ферментные системы как гомогенный раствор со свободно плавающими ферментами и метаболитами, выделилось направление, основанное на пространственной и структурной организации ферментных систем. В рамках этого направления разработаны различные методические подходы для решения проблемы надмолекулярной организации метаболических процессов в клетке. Так, целый ряд работ посвящен экспериментальному исследованию взаимодействия различных структурных компонентов клетки с ферментами важнейших метаболических путей, в частности, гликолиза.

Впервые взаимодействие гликолитических ферментов со структурными белками мышц было описано Н. Arnold, D. Pette (1968), которые установили, что на долю F-актина приходится больше связанных ферментов гликолиза, чем на долю миозина, актомиозина и белков стромы. Из ферментов наибольшим сродством к F-актину обладает альдолаза, несколько меньшим — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа. Определенную способность к взаимодействию проявляют также фосфофруктокиназа, 3-фосфоглицераткиназа, пируваткиназа и лактатдегидрогеназа. F. M. Clarke, C. J. Masters (1975) изучили способность ферментов гликолиза образовывать ферментативно-активные комплексы с F-актином и F-актин—тропомиозин—тропонин из мышц быка. Они показали, что такие ферменты, как фосфофруктокиназа, альдолаза, пируваткиназа, лактатде-

гидрогеназа, глюкозо-6-фосфатизомераза, легко ассоциируют с F-актином и нативным тонким филаментом. Причем наибольшее сродство эти ферменты проявляют к комплексу F-актин—тропомиозин—тропонин. Триозофосфатизомераза, фосфоглицераткиназа, фосфоглицератмутаза, енолаза и гексокиназа связываются гораздо медленнее. Наилучшие условия ассоциации наблюдались при физиологической концентрации солей — 5,0 ммоль/л KCl и высокой концентрации миогена — 35 мг/мл. Это взаимодействие чувствительно к изменению ионной силы: KCl в концентрации 150 ммоль/л предотвращает образование комплексов.

В опытах по экстракции ферментов из грудной мышцы курицы также была показана специфическая адсорбция гликолитических ферментов, особенно глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы (J. D. Ehmann, H. O. Hultin, 1973; R. L. Melnick, H. O. Hultin, 1973). Кинетические параметры обоих ферментов при связывании изменялись: максимальная скорость и константа Михаэлиса выше для свободной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы; при переходе лактатдегидрогеназы в связанную форму предотвращается ее ингибирование пируватом.

Предположение о существовании на мембране эритроцитов структурно упорядоченного комплекса гликолитических ферментов было высказано еще в 1965 г. D. E. Green et al. Позднее с использованием метода седиментации на препарате миогена было обнаружено увеличение кажущихся молекулярных масс альдолазы, лактатдегидрогеназы, пируваткиназы и фосфофруктокиназы (F. M. Clarke, C. J. Masters, 1973). Полученные результаты подтвердили наличие полиферментных комплексов гликолитических компонентов при физиологических условиях pH и ионной силы.

На основе анализа данных по внутриклеточному распределению ферментов гликолиза в мышечных клетках D. Pette (1975) пришел к заключению о существовании упорядоченного мультиферментного комплекса гликолитических ферментов, адсорбированных на структурных белках мышц. Гистохимическими исследованиями подобный комплекс ферментов был выявлен в изотропной зоне миофибрилл мышечных волокон (P. Sigel, D. Pette, 1969).

J. Mowbray, V. Moses (1976) обнаружили мультиферментный комплекс, обладающий активностями всех ферментов гликолиза, в растворимой фракции разрушенных механическим путем сферопластов *Escherichia coli*. F. R. Oppendoes и P. Borst (1977) выявили, что полный набор ферментов гликолиза африканской

трипаносомы *Trypanosoma brucei* упакован в примембранной органелле, названной ими “гликосомой”.

При изучении обратимого связывания ферментов гликолиза в скелетных мышцах было высказано предположение о том, что ассоциация — диссоциация этих ферментов с сократительным аппаратом является регулятором гликолитического пути (Т. Р. Walsh et al., 1981).

В ряде работ обсуждается возможный характер пространственной организации комплекса ферментов гликолиза. П. Фридрих предложил гипотетическую схему расположения ферментов в мембране эритроцитов (рис. 20). Идея схемы состоит в наложении последовательно расположенных ферментов центральной части гликолиза на пучок “хвостов” белка полосы 3, имеющих весьма специфичные участки для связывания каждого фермента. Схема учитывает также возможное участие белков цитоскелета (актина) в процессе связывания отдельных ферментов.

Б. И. Курганов и соавт. (1986, 1988) выдвинули гипотетическую модель структур комплекса гликолитических ферментов в скелетных мышцах, а также на внутренней поверхности мембраны эритроцитов. Возможность объединения гликолитических ферментов в комплекс предопределена тем, что их молекулы имеют центры узнавания своих “соседей”, а однозначность сборки достигается тем, что в ней принимает участие якорный белок подложки, на

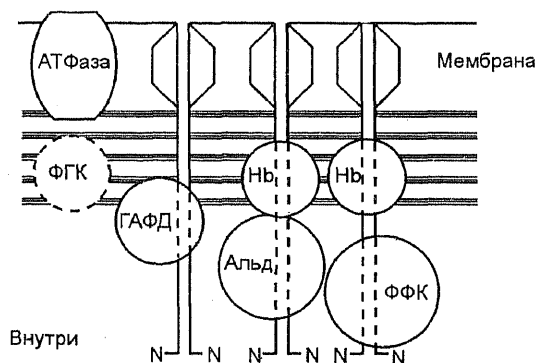


Рис. 20. Гипотетическая схема расположения ферментов в мембране эритроцитов (П. Фридрих, 1986). Димеры В-3-Р (белка полосы 3) — погруженные в мембрану гексагональные структуры. Их N-концы формируют в липидном бислое каналы для анионов и выступают в цитоплазму. ФГК — 3-фосfogлицераткиназа; Hb — гемоглобин; ГАФД — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; Альд. — альдолаза; ФФК — фосфофруктокиназа

которой формируется комплекс. Комплексы отдельных гликолитических ферментов непрочны, что затрудняет их изучение в растворе. Кооперативность процесса ассоциации приводит к тому, что ассоциация должна протекать по принципу “все или ничего”. Комплекс гликолитических ферментов формируется на тонких нитях изотропной зоны миофибрилл мышечных волокон, образованных F-актином и регуляторными белками — тропомиозином и тропонином, или на димерах белка полосы 3, погруженных в мембрану эритроцитов. Физиологический смысл формирования комплекса ферментов, участвующих в общем метаболическом пути, на подложке биологической природы состоит в том, что клетка получает возможность регулировать метаболическую систему как единое целое с помощью химических сигналов, воздействующих на “якорный” белок подложки (Б. И. Курганов, 1986).

Предполагают, что в скелетных мышцах гликолитическая система стимулируется ионами Ca^{2+} , связывающимися с “якорным” белком подложки — тропонином С. Первый этап сборки комплекса — это, по всей вероятности, посадка фосфофруктокиназы на “якорный” белок. Остов “ядра” комплекса, так называемое “ядрышко”, образуют в мышечной ткани, кроме фосфофруктокиназы, альдолаза и глицеральдегидфосфатдегидрогеназа. В состав “ядра” входят глюкозофосфатизомераза, пируваткиназа, лактатдегидрогеназа и фосfogлицераткиназа. Остальные компоненты комплекса (фосfogлицеромутаза, енолаза, триозофосфатизомераза, глицерол-3-фосфатдегидрогеназа) занимают, очевидно, положения на периферии комплекса (рис. 21).

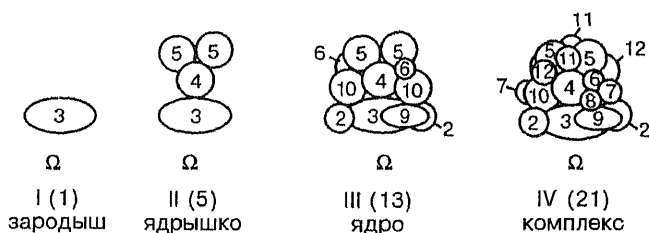


Рис. 21. Этапы сборки комплекса ферментов гликолиза: Ω — якорный белок подложки; 2 — глюкозофосфатизомераза; 3 — фосфофруктокиназа; 4 — альдолаза; 5 — глицеральдегидфосфатдегидрогеназа; 6 — фосfogлицераткиназа; 7 — фосfogлицеромутаза; 8 — енолаза; 9 — пируваткиназа; 10 — лактатдегидрогеназа; 11 — триозофосфатизомераза; 12 — глицерол-3-фосфатдегидрогеназа. В скобках указано число молекул ферментов в состояниях I—IV комплекса

Сборка гликолитического метаболона на внутренней поверхности мембраны эритроцитов происходит на гексамерах (тримерах димеров) белка полосы 3, имеющих ось симметрии третьего порядка, перпендикулярно к плоскости мембраны. Первым этапом сборки комплекса гликолитических ферментов является адсорбция 6-фосфофруктокиназы (ей принадлежит ключевая роль) на олигомерах белка полосы 3 (Б. И. Курганов, А. Е. Любарев, 1988). Метаболон содержит тройной набор ферментов, его молекулярная масса составляет $4,5 \cdot 10^6$ Да (рис. 22). Метаболон является мобильной структурой и находится в подвижном равновесии со свободными ферментами, которое контролируется клеточными метаболитами (Б. И. Курганов и соавт., 1986). Микроком-

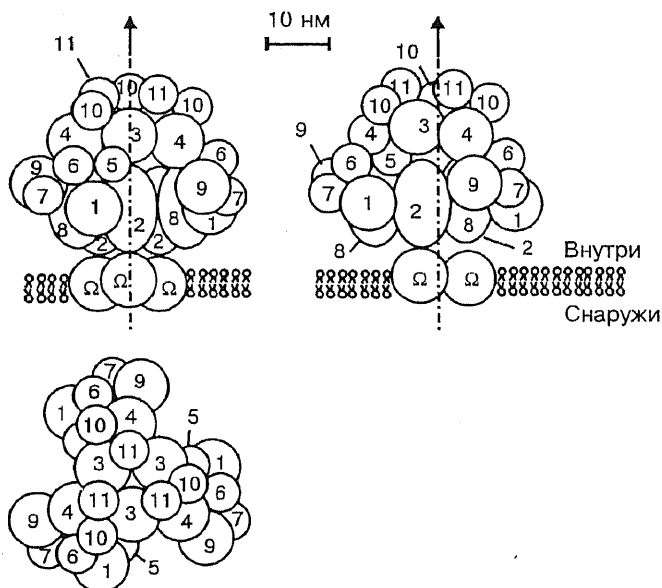


Рис. 22. Гипотетическая структура комплекса ферментов гликолиза, формирующегося на внутренней поверхности мембраны эритроцитов (три проекции) (Б. И. Курганов, А. Е. Любарев, 1988): Ω — димер белка полосы 3; 1 — глюкозофосфатизомераза; 2 — 6-фосфофруктокиназа; 3 — фруктозобисфосфатальдолаза; 4 — глицеральдегидфосфатдегидрогеназа; 5 — фосfogлицераткиназа; 6 — мультифункциональный фермент, обладающий фосfogлицеромутазной, бис-фосfogлицеромутазной и бис-фосfogлицератфосфатазной активностями; 7 — енолаза; 8 — пируваткиназа; 9 — лактатдегидрогеназа; 10 — триозофосфатизомераза; 11 — глицерол-3-фосфатдегидрогеназа

партмент имеет вход(ы) для поступления исходных субстратов и выход(ы) конечных продуктов метаболического пути. “Места” выхода АТФ — продукта гликолитического пути — в комплексе ферментов гликолиза находятся вблизи фосфоглицераткиназы и пируваткиназы. По-видимому, АТФ, продуцируемый фосфоглицераткиназой, утилизируется Na^+ , K^+ -АТФазой.

Таким образом, комплекс гликолитических ферментов, адсорбированный на димерах белка полосы 3, может находиться в контакте с Na^+ , K^+ -АТФазной системой и обеспечивать потребности последней в АТФ. Взаимодействия ферментов, входящих в состав мультиферментного комплекса, обеспечивают возможность регулирования функциональной активности комплекса как единого целого. Роль факторов контроля отводится в данном случае не интермедиатам метаболического процесса, а внешним факторам — вторичным посредникам, с помощью которых осуществляется оптимальное функционирование мультиферментного комплекса в рамках системы более высокого уровня сложности, т.е. в клетке. Рассмотрим это на следующем примере. Димер белка полосы 3 эритроцитарных мембран способен взаимодействовать с ионами кальция. Концентрация ионов кальция в эритроцитах составляет 10—20 мкмоль/л. Внутриклеточная концентрация кальция может повышаться в ответ на связывание гормонов и нейромедиаторов соответствующими рецепторами, встроенными в мембрану эритроцитов (см. раздел 2.1.). Изменение степени насыщения якорного белка ионами кальция будет приводить к конформационным изменениям якорного белка и, следовательно, молекул ферментов комплекса, находящихся в непосредственном контакте с якорным белком. В результате изменяются каталитические свойства всех ферментов гликолиза. Кроме того, происходит снятие стерических затруднений для входа субстратов в микрокомпартмент и дальнейшей химической трансформации в микрокомпартменте. Якорный белок — центр управления гликолитическим комплексом — может фосфорилироваться с участием протеинкиназ, которые активируются сАМР — вторичным мессенджером.

Следовательно, сборка ферментов, участвующих в общем метаболическом пути, приводит к ослаблению изостерических и аллостерических механизмов и обеспечивает возможность реализации иерархически более “высокого” регуляторного механизма, осуществляющего контроль функционирования метаболической систе-

мы как целого. Этот механизм контроля реализуется с участием вторичных мессенджеров, т.е. является механизмом слежения, переключающим функционирование метаболической системы в новый режим в соответствии с сигналами, поступающими от более высоких уровней контроля метаболизма. Механизм контроля функционирования мультиферментного комплекса как целого осуществляется с более высокой скоростью в сравнении с изостерическими и аллостерическими механизмами регуляции.

Мультиферментные комплексы, формирующиеся на подложках биологической природы, являются мобильными образованиями, которые находятся в равновесии со свободными ферментами. Это обстоятельство определяет возможность эффективного осуществления и взаимодействия в клетке и механизмов гомеостаза, и механизмов слежения.

Ферменты, связанные общими метаболитами или коферментами, находятся в метаболоне рядом друг с другом. Это обеспечивает эффективное продвижение интермедиатов по конвейеру активных центров в микрокомпарimente, образующемся при сборке метаболона (Б. И. Курганов, А. Е. Любарев, 1988).

На основе данных о пространственной организации метаболических процессов в цитоплазме эукариотической клетки А. Г. Рязанов и А. С. Спирин (1989) построили эстафетную модель работы ферментов в клетке, которая объясняет молекулярный механизм компартментализации. Модель основана на трех постулатах: ассоциации ферментов с субклеточными структурами, передачи метаболитов между ферментами без диффузии в растворе и десорбции ферментов с поверхностей внутриклеточных структур в процессе каждого акта катализа (рис. 23). Важным преимуществом механизма “эстафеты у поверхности” является то, что он приводит к

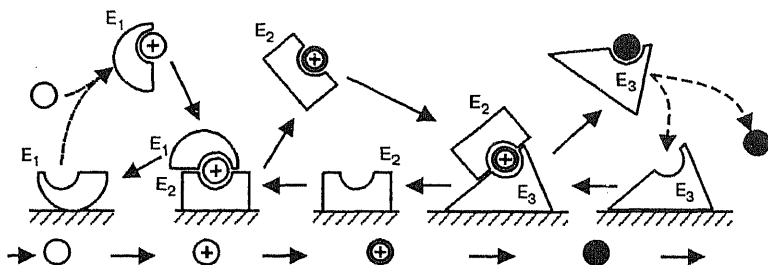


Рис. 23. Схема эстафетной передачи метаболитов между ферментами у поверхности внутриклеточной структуры

концентрированию и компартментализации ферментов данного метаболического пути вблизи места потребления конечного продукта. Те или иные модификации ферментов или поверхности, изменяющие их взаимное сродство, создают возможности нового механизма регуляции метаболических процессов за счет пространственного перераспределения ферментов в клетке.

Концепция метаболической регуляции посредством динамической сборки и разборки ферментных комплексов обсуждается также в работе J. Ovadi (1988).

J. Batke (1989) предложена схема процессов взаимодействия между ферментами гликолиза в мышцах (рис. 24).

На основании анализа результатов исследования взаимодействия ферментов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), связанного со множеством анаболических и катаболических процессов, с внутренней мембраной митохондрий, а также белок-белковых взаимодействий А. Е. Любаревым и Б. И. Кургановым (1987) разработана модель, описывающая пространственную структуру комплекса ферментов этого центрального метаболического пути. Предположение о существовании комплекса ферментов ЦТК ими было высказано с учетом следующих экспериментальных дан-

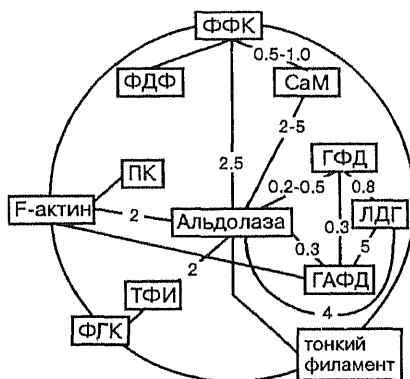


Рис. 24. Схема взаимодействия между ферментами гликолиза в мышцах: ФФК — фосфофруктокиназа; ФДФ — фруктозо-1,6-дифосфатаза; ГАФД — глицеральдегидфосфатдегидрогеназа; ФГК — фосфоглицераткиназа; ПК — пируваткиназа; ЛДГ — лактатдегидрогеназа; ТФИ — триозофосфатизомераз; ГФД — глицерол-3-фосфатдегидрогеназа; СаМ — кальмодулин. Линиями обозначена возможность комплексования *in vitro*, цифрами представлены значения K_d в микромолях

ных и теоретических расчетов: концентрация белка в матриксе митохондрий, где локализованы ферменты ЦТК, составляет 40 вес. %; в этих условиях затруднена диффузия молекул ферментов и их кофакторов; среднее расстояние между внутренними поверхностями внутренней мембраны митохондрий сердца составляет 15—30 нм.

Авторы считают, что комплекс ферментов ЦТК представляет собой гексамер из шести идентичных асимметричных субъединиц, каждая из которых содержит тетрамер транссукцинилазы, по одной молекуле остальных ферментов и “якорный” белок. Комплекс “зажат” между противоположными поверхностями внутренней мембраны митохондрий, причем с мембранами контактируют все ферменты, за исключением α -кетоглутаратдегидрогеназы и аспаратаминотрансферазы. В качестве “якорных” белков выступают интегральные белки внутренней митохондриальной мембраны, в том числе сукцинатдегидрогеназа. Они обеспечивают сборку комплекса ферментов ЦТК на мембране, высота которого вдоль оси симметрии третьего порядка составляет 20 нм, а диаметр — 50 нм. Молекулярная масса (без учета сукцинатдегидрогеназы) равна 8 мДа. Структура предложенной модели допускает возможность взаимодействия этого комплекса с другими ферментами и мультиферментными ансамблями, с которыми он связан общими метаболитами, и, прежде всего, с комплексами цепи переноса электронов внутренней мембраны митохондрий. Кроме того, метаболон ЦТК должен взаимодействовать с другими ферментами матрикса. Для митохондрий сердца в качестве таких белков выступают пируватдегидрогеназный комплекс и ферменты β -окисления жирных кислот, поставляющие в ЦТК ацетилкофермент А.

Комплекс ферментов ЦТК — мобильная структура, находящаяся в равновесии со свободными ферментами матрикса. Обратимое равновесие между свободными и связанными ферментами контролируется целым рядом факторов: концентрациями определенных метаболитов в матриксе митохондрий (цитрата, оксалоацетата, кофермента А, ацетилкофермента А, Mg^{2+} -АТФ и др.), концентрацией белка, энергетическим состоянием митохондрий. Взаимодействия ферментов, входящих в состав метаболона ЦТК, обеспечивают функционирование этого надмолекулярного комплекса ферментов как целостной, кооперативно действующей системы.

В то же время нет убедительных доказательств существования надмолекулярного комплекса какого-либо метаболического пути или его фрагмента. Прямым подтверждением существования *метаболона* (надмолекулярного комплекса ферментов, катализирующих последовательные стадии ферментной системы) может быть либо его выделение, либо реконструкция *in vitro* и экспериментальное доказательство туннелирования между ферментами-соседями (Г. Л. Ермаков, 1993). Такие попытки предпринимаются, например, для ферментов гликолиза, цикла Кребса и цикла мочевины.

Таким образом, в настоящее время широко обсуждается проблема пространственно-структурной организации ферментных систем. Вместе с тем отсутствуют исчерпывающие данные, касающиеся изучения фермент-ферментных, фермент-мембранных взаимодействий, взаимосвязи физико-химических характеристик белков с их способностью образовывать надмолекулярные комплексы, выяснения роли цитоскелета клетки в организации клеточного метаболизма. Кроме того, схемы надмолекулярной организации компонентов метаболических систем требуют экспериментальных доказательств.

2.3.3. Пути регулирования активности векторных ферментов биомембран

Одним из наиболее актуальных вопросов современной мембранологии является выяснение принципов и механизмов регуляции векторных ферментов биомембран (в том числе Na^+ , K^+ -АТФазы), выполняющих разнообразные “жизненно важные” функции не только для отдельных мембранных структур, но и для клетки в целом. Полифункциональный характер Na^+ , K^+ -АТФазы (см. раздел 1.2.4), т.е. сочетание в ней метаболической, транспортной и рецепторной функций, определяет существование достаточно сложных механизмов ее регуляции. Кроме того, изучение механизмов функционирования и регулирования транспортных АТФаз на уровне отдельных клеток и субклеточных компонентов актуально не только в теоретическом, но и в практическом аспекте для оценки степени и характера нарушений этих механизмов при некоторых патологических состояниях, связанных с изменением ионного состава среды и накоплением активных форм кислорода (см. главу 3). Рассмотрим основные пути регулирования функциональной активности одного из ключевых

векторных ферментов плазматических мембран клеток – Na^+ , K^+ -АТФазы.

По современным представлениям, Na^+ , K^+ -АТФаза является типичным липидзависимым ферментом: для формирования его функционально-активной конформации необходимы кислые липиды. Показано, что мембранные гликолипиды, локализованные преимущественно в наружной половине бислоя, обеспечивают правильную ориентацию Na^+ , K^+ -АТФазного комплекса относительно плоскости мембраны (т.е. они отвечают за проявление векторных свойств фермента). Вместе с тем остается неясным, какова специфическая роль мембранных фосфолипидов в обеспечении транспортной функции Na^+ , K^+ -АТФазы. По-видимому, функционирование центров связывания нуклеотидов и катионов на молекуле фермента не зависит от липидов, тогда как для осуществления конформационных перестроек в ферментном белке важна его связь с мембранными липидами. Кривые, описывающие зависимость ферментативной активности от концентрации липида, имеют сигмоидную форму, что свидетельствует о кооперативном характере связывания липидов с белком. Однако абсолютная потребность фермента в тех или иных фосфолипидах (или их полярных головках) экспериментально не доказана. Так, опыты по ферментативному превращению одних фосфолипидов в другие (например, фосфатидилсерина в фосфатидилэтаноламин) в препаратах мембраносвязанной Na^+ , K^+ -АТФазы показали, что фермент может функционировать без отрицательно заряженных фосфолипидов, но с уменьшением молекулярной активности.

Получены данные, свидетельствующие о том, что липиды, создающие микроокружение Na^+ , K^+ -АТФазы в биомембранах, характеризуются сравнительно низкими энергиями взаимодействия с ферментом. Существует мнение, что Na^+ , K^+ -АТФаза не имеет аннулюса в традиционном понимании этого термина. Вместе с тем исследования с использованием ЭПР-спектроскопии спин-меченных фосфолипидов показали, что фермент оказывает существенное влияние на фосфолипидный состав ближайшего микроокружения в мембране, преимущественно связывая отрицательно заряженные фосфолипиды. Оказалось, что сродство Na^+ , K^+ -АТФазы к отрицательно заряженным фосфолипидам в среднем в 4 раза больше, чем к положительно заряженным, и $\approx$ в 2,5 раза больше, чем к нейтральным. Эта избирательность фермента по отношению к заряду молекул фосфолипидов может

быть связана с наличием положительно заряженных боковых цепей аминокислотных остатков во внутримембранном домене Na^+ , K^+ -АТФазы, взаимодействующем с полярными головками фосфолипидов из ближайшего микроокружения. Для ряда интегральных мембранных белков обнаружены такие боковые цепи — остатки аргинина и лизина, преимущественно взаимодействующие с отрицательно заряженными фосфолипидами бислоя. Получены доказательства того, что изменение физического состояния липидного окружения Na^+ , K^+ -АТФазы под влиянием температуры, содержания в нем холестерина, длины цепи и степени ненасыщенности жирных кислот, входящих в состав фосфолипидов, может влиять на активность этого фермента.

I. J. De Pont et al. (1978) показали, что гидролиз различных фосфолипидов, содержащихся в высокоочищенном препарате Na^+ , K^+ -АТФазы из ткани почек крокодила с помощью фосфолипазы С, существенно не влияет на активность фермента. С другой стороны, удаление 60 % фосфолипидов из такого же препарата белка с помощью фосфолипазы А приводило к потере 70 % АТФазной активности, в то время как число убаин-связывающих центров оставалось неизменным. Такой разброс данных о липидной “потребности” Na^+ , K^+ -АТФазы объясняется тем, что снижение ферментативной активности обусловлено не только уменьшением содержания фосфолипидов, но и ингибирующим действием жирных кислот, образующихся при гидролизе фосфолипидов фосфолипазами.

Все вышеизложенное свидетельствует о том, что целый ряд вопросов, касающихся детального выяснения роли липидного матрикса в функционировании мембраносвязанной Na^+ , K^+ -АТФазы, остается недостаточно изученным.

По всей вероятности, Na^+ , K^+ -АТФаза находится в тесной пространственной и функциональной взаимосвязи не только с липидами, но и с мембранными белками. Были получены доказательства взаимодействия этого фермента с периферическим белком мембранного скелета — анкирином, установлена его связь с анионным переносчиком — белком полосы 3, выявлено регуляторное влияние на активность АТФазы спектрин-актинового комплекса. Имеются данные, указывающие на возможность образования за счет белок-белковых взаимодействий в мембране эритроцитов сложных мультимерных комплексов, состоящих из глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, фосфоглицераткиназы,

фосфоглицератмутазы и Na^+ , K^+ -АТФазы. Между указанными ферментами существует функциональное сопряжение, за счет которого субстраты — 1,3-дифосфоглицерат и АТФ — непосредственно транспортируются от одного компонента системы к другому.

Известно, что Na^+ , K^+ -АТФаза может быть функционально связана с такими мембранными системами как, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник, рецептор инсулина, β -адренорецепторы, сАМР-зависимая протеинкиназа, аденилатциклаза.

Обсуждается вопрос о существовании *in vivo* пространственной и функциональной взаимосвязи между мембраносвязанными Na^+ , K^+ -АТФазой и ацетилхолинэстеразой. Субстрат ацетилхолинэстеразной реакции — ацетилхолин был одним из первых соединений, идентифицированных как нейротрансмиттеры. Он принадлежит к группе нейротрансмиттеров, вызывающих деполаризацию постсинаптических мембран, которая приводит к возникновению пикового потенциала и торможению активности Na^+ , K^+ -АТФазы. Действие ацетилхолина в основном устраняется путем его энзиматического расщепления ацетилхолинэстеразой.

Регуляторные механизмы, в реализации которых, очевидно, участвуют вторичные мессенджеры (например, Ca^{2+} и сАМР), гормоны, биогенные амины, нейротрансмиттеры и другие факторы, наименее изучены. Однако не вызывает сомнений, что именно благодаря им происходит более тесное сопряжение натриевого насоса с важнейшими процессами клеточного метаболизма.

Существенное значение для проявления функциональной активности Na^+ , K^+ -АТФазы и других векторных ферментов (Ca^{2+} -АТФаза, аденилатциклаза, цитохромоксидаза), состоящих из нескольких субъединиц, имеют степень олигомеризации и кооперативные взаимодействия субъединиц или доменов в составе олигомерных молекул, которые находятся под контролем внутренних и внешних факторов. Все вышеперечисленные регуляторные звенья, а именно: взаимодействие физиологических лигандов со специфическими центрами связывания; индуцируемые лигандами взаимодействия доменов внутри субъединиц, отдельных субъединиц, протомеров, олигомерных комплексов; модуляторные эффекты липидного матрикса — лежат в основе краткосрочной (быстрой) или “оперативной” регуляции активности векторных ферментов биомембран при изменении функционального состояния клетки. Этот механизм реализуется за счет электростатических, гидрофобных, ван-дер-ваальсовых взаимодействий,

водородных, ковалентных связей, участвующих в поддержании липид-белковых, белок-белковых, липид-липидных взаимодействий (раздел 1.4).

“Долгосрочный” механизм регулирования активности мембранных ферментов реализуется за счет белоксинтезирующей системы клетки и заключается в поддержании оптимального соотношения между скоростью биосинтеза и распада этих ферментов. Он направлен на обеспечение биогенеза необходимого количества функционально активных молекул и олигомерных комплексов векторных ферментов, приходящихся на единицу площади поверхности мембраны. “Долгосрочный” механизм связан с действием различных гормонов, вторичных мессенджеров и других факторов на плазматическую мембрану клетки.

Биосинтез векторных ферментов биомембран на начальных стадиях происходит аналогично синтезу большинства белков эукариотических клеток, однако имеет и ряд особенностей. Так, мембранные белки синтезируются, как правило, в виде неактивных форм (проферментов), которые с помощью селективного протеолиза превращаются в активные формы в ходе посттрансляционной модификации. Вероятно, биосинтез различных субъединиц олигомерных молекул мембранных белков происходит на разных мРНК в шероховатой (гранулярной) эндоплазматической сети. Полагают, что эффективность синтеза мембранных белков значительно повышается за счет объединения отдельных рибосом в полисомы. Однако более детальные исследования, касающиеся выявления важных аспектов биогенеза мембранных белков, остаются не выясненными до настоящего времени.

“Краткосрочный” и “долгосрочный” механизмы регулирования активности мембранных ферментов в реальных условиях *in vivo* дополняются многочисленными компонентами: функциональным “сопряжением” одного фермента с другими, наличием каскадных механизмов регуляции, “модуляцией” активности белков мембран в результате воздействия физических агентов. В целом процесс регулирования функционирования векторных белков-ферментов биомембран рассматривается как сложное-взаимодействие “подсистем” универсального регуляторного механизма, обеспечивающее структурно-функциональную интеграцию компонентов мембран и поддержание клеточного гомеостаза (рис. 25). Универсальность основных регуляторных механизмов векторных ферментов биомембран обусловлена сходством их

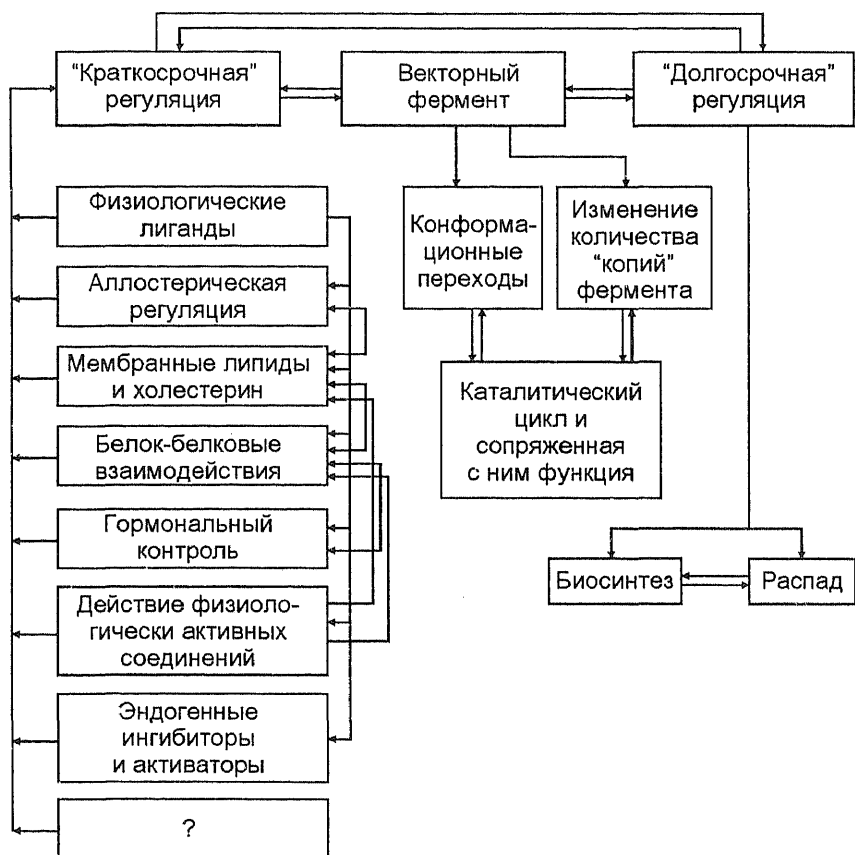


Рис. 25. Схема процессов регуляции активности векторных ферментов биомембран (А. В. Кравцов, И. Р. Алексеенко, 1990)

структурной организации и трансмембранным характером выполняемых ими функций. Вместе с тем остается открытым вопрос о приоритетности того или иного регуляторного механизма и об их взаимодействии в процессе функционирования каждого конкретного фермента. Таким образом, разрабатываемая в настоящее время концепция общности принципов регуляции активности ферментов, выполняющих трансмембранные функции, требует новых экспериментальных доказательств.

2.3.4. Молекулярные механизмы нейрогуморальной регуляции функций клеток

Функционирование клеток различных тканей в составе целостного организма обеспечивается взаимосвязанными механизмами нейрогуморальной регуляции с участием нейромедиаторов и гормонов, синтезируемых соответственно нервными клетками и железами внутренней секреции. Следует подчеркнуть, что основные механизмы (рис. 26) такой регуляции реализуются при непосредственном участии различных молекулярных компонентов биомембран. Охарактеризуем более подробно представленные на этом рисунке пути регулирования функций клеток.

Первый механизм осуществляется с участием нейромедиаторов, взаимодействующих с мембранными рецепторами клеток, которые представляют собой ионные каналы. Напомним, что ионные каналы — это интегральные белки (гликопротеины), пронизывающие липидный бислой мембраны и способные в результате внешних воздействий (изменение мембранного потенциала, действие медиатора или гормона) избирательно изменять проницаемость мембраны для определенных ионов. Ионным каналам свой-



Рис. 26. Схема основных путей нейрогуморальной регуляции функций клеток (В. А. Ткачук, 1998)

ственным избирательная проницаемость для ионов (селективность) и способность открываться и закрываться при различных воздействиях на мембрану (воротная функция). Воротный механизм работы каналов регулируется сенсором внешнего стимула. В зависимости от локализации сенсора ионные каналы подразделяют на две группы. К первой группе относятся каналы, имеющие собственный сенсор внешнего стимула (первичного посредника), т.е. внешний сигнал воздействует непосредственно на макромолекулу ионного канала. Эта группа включает два семейства ионных каналов: потенциал- и лигандуправляемые. Потенциалуправляемые ионные каналы (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- - каналы) открываются и закрываются при изменении электрического потенциала на мембране. Лигандуправляемые ионные каналы обеспечивают быструю передачу сигналов в химических синапсах. Они открываются при связывании с рецептором специфических агонистов (ацетилхолина, глутамата, γ -аминомасляной кислоты). В каналах второй группы сенсор внешнего сигнала (рецептор первичного посредника) пространственно разобщен с каналом. Взаимодействие сенсора и канала осуществляется с помощью растворимых внутриклеточных посредников (мессенджеров). Это рецепторуправляемые ионные каналы; каналы, опосредованно управляемые химическими сигналами. К ним относятся каналы, управляемые G-белками, которые активируются при связывании лиганда с рецептором (см. раздел 2.1.1).

В результате взаимодействия лиганда — нейромедиатора (например, ацетилхолина) с холинергическим рецептором никотинового типа, формирующим ионный канал, происходят изменение конформации белка ионного канала и переход его в активированное состояние. Через устье канала, в формировании которого участвуют субъединицы олигомерного комплекса, внутрь клетки поступают ионы натрия. Происходит деполяризация, а затем гиперполяризация мембраны. Возникающий на постсинаптической мембране потенциал действия, вызываемый ацетилхолином, возникает и гасится за 1—2 мс, при этом синапс способен проводить от аксона на иннервируемую клетку до 500 имп/с. Быстрое развитие и гашение сигнала возможны благодаря высокой скорости связывания ацетилхолина (полумаксимальное насыщение рецепторов наблюдается в присутствии ацетилхолина в концентрации 10^{-4} моль/л) с рецептором и разрушения его ацетилхолинэстеразой, локализованной на мембране вблизи холинорецеп-

тора. Возвращение ионного канала в закрытое состояние происходит в результате диссоциации гормон-рецепторного комплекса.

Второй механизм регулирования функций клеток реализуется с участием гормонов, действующих через мембранные рецепторы и системы вторичных посредников, стимулирующих химическую модификацию белков (см. раздел 2.1). В качестве примера можно привести функционирование мускаринового холинэргического рецептора, локализованного преимущественно вне синапса. Он активируется ацетилхолином и алкалоидом мускарином. Четыре типа близких по структуре мускариновых рецепторов сопряжены с различными G-белками. Так, M-холинорецепторы способны стимулировать фосфолипазу C, гидролизующую фосфоинозитиды, и могут ингибировать аденилатциклазу, синтезирующую cAMP и активирующую K^+ -каналы. Биологический эффект при этом развивается и гасится в течение десятков минут. Это связано с кинетическими особенностями связывания лигандов с рецепторами, последовательным развитием этапов каскадной передачи сигналов через мембрану в цитозоль, медленно протекающими химическими реакциями синтеза вторичных мессенджеров, фосфорилирования и дефосфорилирования внутриклеточных белков.

В каждой клетке имеются 7—10 различных типов рецепторов, взаимодействующих со специфическими регуляторами (нейромедиаторами, гормонами, простагландинами, факторами роста). Для каждого регулятора характерны определенные параметры: продолжительность и амплитуда сигнала, соотношение активностей компонентов систем вторичных мессенджеров и др.

Третий механизм регулирования функционирования клеток реализуется в том случае, если секретируемые эндокринными железами стероидные и тиреоидные гормоны, имеющие липофильную природу, взаимодействуют с цитозольными или ядерными рецепторами. Эти рецепторы характеризуются высоким сродством к указанным гормонам (полумаксимальное насыщение рецепторов происходит в присутствии гормона в концентрации 10^{-9} — 10^{-10} моль/л). Образующийся гормон-рецепторный комплекс, стабильный в течение 1—3 ч, связывается с ДНК и белками хроматина и влияет на экспрессию определенных генов. Трансляция синтезируемой мРНК на рибосомах приводит к появлению 3—7 новых белков, опосредующих биологический эффект стероидных и тиреоидных гормонов. Этот тип регуляции осуще-

ствляется в течение 3—6 ч после поступления гормона в кровь, а прекращается через 6—12 ч. Не исключается возможность и репрессирования отдельных генов, что приводит к уменьшению концентрации определенных белков в клетке.

Гормоны контролируют синтез не только различных ферментов, участвующих в процессах анаболизма и катаболизма клетки, но и протеинкиназ, фосфопротеинфосфатаз, рецепторов-каналоформеров, регуляторных белков и ферментов, участвующих в функционировании систем передачи информации в клетке с участием вторичных посредников. Это один из путей интеграции и взаимовлияния отдельных механизмов нейрогуморальной регуляции функций клеток в составе целостного организма.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Что представляют собой вторичные мессенджеры?
2. Какими свойствами характеризуются мембранные белки-рецепторы?
3. Что понимают под “каскадом” передачи внешнего сигнала через клеточную мембрану?
4. Назовите основные типы мембранных рецепторов, охарактеризуйте их свойства и функции.
5. Каковы функции G-белков?
6. Что такое амплификация внешнего сигнала?
7. Охарактеризуйте этапы передачи информации в клетку по аденيلاتциклазному пути.
8. Какие внутриклеточные мессенджеры участвуют в передаче сигнала через клеточную мембрану по фосфоинозитидному пути?
9. Какова роль мембранных фосфолипидов в реализации фосфоинозитидного механизма передачи информации?
10. Какова роль ионов кальция в реализации различных процессов клеточного метаболизма?
11. Какие мембранные транспортные системы принимают участие в регулировании уровня кальция внутри клетки?
12. Какие факторы обеспечивают асимметричное распределение одновалентных ионов внутри и вне клетки?
13. Охарактеризуйте основные механизмы регулирования функциональной активности ферментов и ферментных систем в клетке.
14. Какова роль мембран в интеграции процессов клеточного метаболизма?
15. Что понимают под адсорбционным механизмом регулирования ферментативной активности?
16. Что называют метаболоном?

17. Какие теоретические и экспериментальные предпосылки послужили основой для создания концепции о пространственно-структурной организации важнейших метаболических систем клетки?

18. Каково физиологическое значение образования гликолитического метаболита?

19. Какие факторы оказывают влияние на функционирование компонентов метаболита?

20. Охарактеризуйте сущность эстафетной модели функционирования ферментов в клетке.

21. Что понимают под “краткосрочной” и “долгосрочной” регуляцией активности векторных ферментов биомембран?

22. Предложите план проведения экспериментов по выявлению роли отдельных компонентов биомембран в функционировании ключевого фермента ионного гомеостаза клетки — Na^+ , K^+ -АТФазы.

23. В чем заключается взаимосвязь трех основных механизмов нейроморальной регуляции функций клеток?

Глава 3

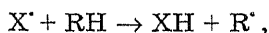
МЕХАНИЗМЫ МОДИФИКАЦИИ КОМПОНЕНТОВ БИОМЕМБРАН ПРИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ: РОЛЬ АКТИВНЫХ КИСЛОРОДНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

В основе многих патологических состояний организма человека лежат изменения структурно-функциональных свойств молекулярных компонентов биомембран, индуцированные воздействием внешних факторов среды (фармакологические агенты, яды, токсины, аллергены, ионизирующее и УФ-излучение и др.) или внутренними функциональными расстройствами. К заболеваниям подобного рода следует отнести гипертонию, атеросклероз, ишемическую болезнь сердца, стрессорные заболевания сердца, бронхолегочные заболевания, различные воспаления, злокачественный рост клеток. В связи с этим всесторонние исследования механизмов функционирования биомембран в норме и при патологии необходимы как для разработки методов лечения и профилактики вышеперечисленных заболеваний, так и для создания высокоэффективных лекарственных препаратов.

3.1. ПЕРОКСИДНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ КАК ОДИН ИЗ КЛЮЧЕВЫХ МЕХАНИЗМОВ МОДИФИКАЦИИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ БИОМЕМБРАН

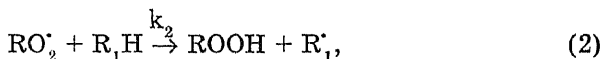
Ведущую роль в развитии многих патологических состояний организма играет свободно-радикальное *пероксидное окисление липидов* (ПОЛ). Наиболее вероятным субстратом ПОЛ в организме являются полиеновые липиды биомембран. В гомогенных системах процесс ПОЛ протекает по свободнорадикальному цепному механизму. Первичные свободные радикалы появляются в ходе реакции инициирования цепи или катализа, которую считают начальным этапом ПОЛ. Иницирующими факторами ПОЛ в мембранах выступают ферментные системы природных мембранных структур (например, NADPH-зависимая система), ионизирующее и УФ-излучение, различные активные формы кислорода (АФК). Последние способны индуцировать ПОЛ как в темновых процессах (например, при фагоцитозе), так и при воздействии УФ-света, фотоповреждении сетчатки глаза и др.

Реакция инициирования цепи имеет вид



где $X^{\cdot}$ — свободный радикал, иницирующий цепь; RH — ненасыщенная жирная кислота липида; $R^{\cdot}$ — алкильный свободный радикал липида.

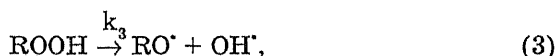
Затем следуют реакции продолжения цепи:



где $RO_2^{\cdot}$ — пероксидный радикал липида; $ROOH$ — гидропероксид липида.

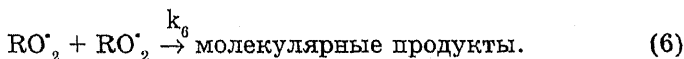
Константа скорости k_1 реакции составляет 10^7 — 10^8 л/моль·с, а энергия активации практически равна нулю. Следовательно, при обычных концентрациях кислорода ($>10^{-6}$ моль/л) все радикалы $R^{\cdot}$ превращаются в $RO_2^{\cdot}$. Реакция (2) также имеет низкую энергию активации и высокую константу скорости k_2 , величина которой зависит от типа окисляющегося соединения.

Разветвление цепи осуществляется в соответствии с реакцией

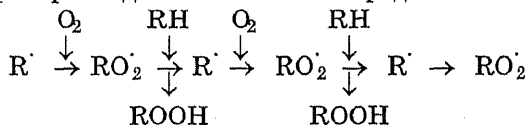


где $RO^{\cdot}$ — алкоксильный радикал; $OH^{\cdot}$ — гидроксильный радикал.

С реакциями продолжения конкурируют реакции, приводящие к обрыву цепи. Возможны следующие варианты спонтанного обрыва цепи:



Сущность цепного процесса окисления состоит в чередовании двух реакций — образования пероксидного радикала липида $RO_2^{\cdot}$, а также гидропероксида $ROOH$ и нового радикала липида $R^{\cdot}$:



Таким образом, в процесс вовлекаются все новые молекулы липида (RH) и кислорода, при этом накапливаются гидропероксиды, а число радикалов R[•] и RO₂[•] не изменяется в соответствии с принципом неунитожимости свободной валентности.

Генерирование липопероксидов в организме сопряжено с нормальными метаболическими реакциями, осуществляемыми специализированными ферментными системами: NADPH-зависимыми микросомальными оксигеназами, циклооксигеназами и липооксигеназами, и служит источником биосинтеза внутриклеточных медиаторов — простагландинов, тромбоксанов, простаглицлина, лейкотриенов и липоксинов. Свободная полиненасыщенная жирная кислота, в частности арахидоновая, образовавшаяся в результате ферментативного гидролиза β-ацилов лецитинов фосфолипазой A₂, может окисляться по двум альтернативным путям — цикло- или липооксигеназному. При циклооксигеназном окислении арахидоната образуются циклические эндопероксиды — простагландины G₂ и H₂, служащие универсальными метаболическими предшественниками различных простагландинов (PGE₂, PGE₂α, PGD₂), тромбоксанов (TXA₂, TXB₂) и простаглицлина (PGI₂). Продуктами липооксигеназного окисления арахидоната являются алифатические гидропероксиды — гидропероксиэйкозатетраеновые кислоты (HPETE) — промежуточные продукты биосинтеза нового класса биологически активных веществ — лейкотриенов (LTA₄, LTB₄, LTC₄, LTD₄) — рис. 27. Производные C₂₀-полиненасыщенных жирных кислот типа арахидоновой, так называемые эйкозаноиды, участвуют в осуществлении защитных реакций клеток желудка, сердца и других органов от повреждений, способствуют развитию воспаления, стимулируют сокращение гладкой мускулатуры. Циклооксигеназные системы обнаружены в большинстве тканей животных, липооксигеназные — в различных животных клетках и тканях: лейкоцитах, тромбоцитах, ретикулоцитах; легких, селезенке, семенниках. Между липооксигеназным и циклооксигеназным путями окисления полиненасыщенных жирных кислот в организме существует тесная взаимосвязь. Ингибирование циклооксигеназного пути окисления этих клеток *in vivo* сопровождается активацией их липооксигеназного окисления, т.е. липооксигеназный путь окисления может использоваться для быстрой утилизации избыточного субстрата биосинтеза простагландинов.

Регуляция процессов ПОЛ в организме также осуществляется ферментативным путем. В микросомах наряду с фермента-

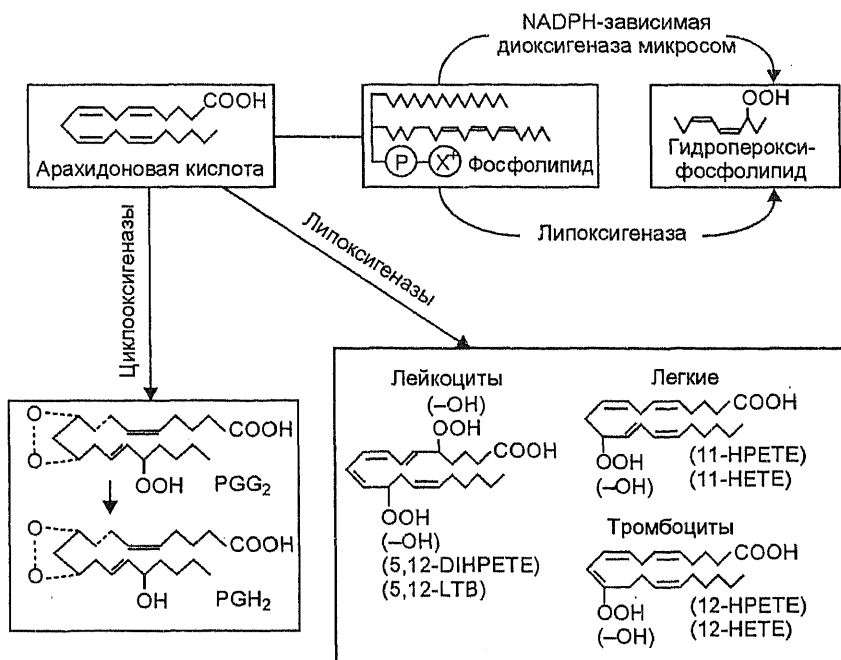


Рис. 27. Основные пути ферментативного биосинтеза пероксидов липидов в тканях млекопитающих (В. З. Ланкин, 1984): HETE — гидроксикозатетраеновые кислоты; HPETE — гидропероксиэйкозатетраеновые кислоты; DIHPETE — дигидропероксиэйкозатетраеновая кислота; LTB — лейкотриены; PGG₂, PGH₂ — простагландины

тивным синтезом пероксидов липидов происходит и их ферментативная утилизация, так как терминальная оксидаза цепи переноса электронов в микросомах — цитохром P₄₅₀ — может функционировать как активная пероксидаза. В цитозоле клеток содержатся восстанавливающие пероксиды липидов глутатионпероксидазные и глутатион-S-трансферазные системы, одной из функций которых является ограничение распространения неферментативных реакций ПОЛ в случае “утечки” свободнорадикальных продуктов ферментативного ПОЛ. Существование специализированных ферментных систем синтеза и утилизации активных форм кислорода и пероксидов липидов делает маловероятным (если не невозможным) протекание в нормальных тканях животных неспецифического процесса — неферментативного ПОЛ с физиологически значимой интенсивностью.

Необходимо отметить, что в клетке существует несколько пусковых и защитных систем, которые рассматриваются как факторы, влияющие на скорость окисления липидов на разных стадиях (зарождение и продолжение цепи; разветвление; обрыв цепи):

- системы, ответственные за строго определенную структурную организацию липидов и влияющие на скорость окисления липидов на разных стадиях (зарождение и продолжение цепи; разветвление; обрыв цепи);

- системы ферментов, ответственных за образование и гибель активных форм кислорода и свободных радикалов или участвующих в разложении пероксидов нерадикальным путем;

- системы, регулирующие обмен фосфолипидов мембран и влияющие на скорость инициирования и продолжения цепей путем изменения состава ненасыщенных жирных кислот фосфолипидов;

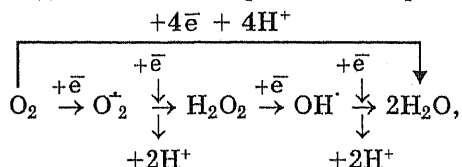
- системы низкомолекулярных регуляторов, выполняющих роль инициаторов, ингибиторов и влияющих на стадию инициирования, разветвления и обрыва цепи.

ПОЛ представляет собой один из важнейших универсальных процессов повреждения мембранных систем, изменяющий химический состав, физические параметры, ультраструктурную организацию и функциональные характеристики биомембран. ПОЛ вызывает обновление липидного состава мембран вследствие удаления легко окисляющихся липидов — фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилинозитола. При ПОЛ возрастает скорость процессов “флип-флоп”-переходов. ПОЛ приводит к увеличению вязкости мембран в результате уменьшения содержания жидких липидов в бислойных участках, появления поперечных межмолекулярных сшивок и возрастания доли упорядоченных липидов с ограниченной подвижностью. Отрицательный заряд на поверхности мембран увеличивается, что обусловлено вторичными продуктами ПОЛ (эпоксиды, кетоны, малоновый диальдегид и др.), содержащими карбонильные и карбоксильные группы. Мембраны эритроцитов, митохондрий, саркоплазматического ретикулума, лизосом становятся проницаемыми для различных ионов, неэлектролитов, макромолекул. Изменяются свойства мембранных белков: Ca^{2+} -АТФазы, Na^+ , K^+ - АТФазы, родопсин, фосфолипазы. Эти функциональные проявления ПОЛ определяют формирование многих патологических состояний организма, возникающих при неблагоприятных условиях и повреждающих воздействиях.

Как уже было отмечено выше, в качестве инициаторов ПОЛ выступают *активные формы кислорода* или активные кислородные метаболиты. Рассмотрим более подробно механизмы их образования и пути утилизации, функциональное значение и роль в развитии патологических состояний организма человека.

3.2. РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В РЕГУЛИРОВАНИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В БИОСИСТЕМАХ

В дыхательной цепи митохондрий аэробных клеток (помимо полного четырехэлектронного восстановления молекулы кислорода до воды) всегда происходит одно- и трехэлектронное восстановление с последовательным образованием различных АФК:



где O_2^- — супероксидный анион-радикал; H_2O_2 — пероксид водорода; $OH^\cdot$ — гидроксильный радикал.

К активным формам кислорода, кроме O_2^- , H_2O_2 , $OH^\cdot$, относятся также синглетный молекулярный кислород 1O_2 , пергидроксильный радикал $HO_2^\cdot$, гипогалоиды, пероксидный радикал $RO_2^\cdot$, алкоксильный радикал $RO^\cdot$. Они могут генерироваться в разнообразных ферментативных и неферментативных реакциях во всех частях клетки. Наибольший вклад в их образование вносит дыхательная цепь митохондрий, а также система цитохрома P_{450} , локализованная в эндоплазматической сети. АФК возникают как спонтанно, так и ферментативно (например, с участием NADPH-оксидазы дыхательного “взрыва” в плазматической мембране и ксантиноксидазы в гиалоплазме). Они вызывают образование органических гидропероксидов $ROOH$ при взаимодействии с биологическими молекулами (ДНК, белками, липидами). Совокупность реакций, индуцируемых АФК и приводящих к формированию гидропероксидов и затем вторичных окисленных продуктов (спиртов, альдегидов, эпоксидов), называют оксидативной модификацией молекул.

В табл. 11 представлены данные, характеризующие механизмы образования, свойства, биологическое действие и пути утилизации АФК.

Таблица 11

Активированные кислородные метаболиты (АКМ) в организме млекопитающих: образование, свойства, утилизация (по Е. Б. Меньшиковой, Н. К. Зенкову, 1993)

Форма АКМ, время жизни, радиус действия	Механизмы образования в живых системах	Биологическое действие	Ингибиторы
1	2	3	4
Супероксидный анион-радикал O_2^- ; 10^{-6} с; 0,3 мкм	Одноэлектронное восстановление кислорода ксантиноксидазой, NADPH-оксидазой фагоцитов, оксидазами аминокислот; образование в цепи транспорта электронов митохондрий и микросом; при окислении оксигемоглобина	Образование пероксида водорода, гидроксильного, пергидроксильного радикалов и синглетного кислорода, индукция ПОЛ, разрушение мембран эритроцитов, усиление пролиферации лимфоцитов, внутриклеточная регуляция, вазомоторное действие	Супероксиддисмутаза, аскорбиновая кислота, церулоплазмин, глутатион
Пергидроксильный радикал HO_2^+ ; 10^{-3} с; 10 мкм	Присоединение H^+ к O_2^- в кислой среде (рКа 4,8); реакция H_2O_2 с органическими пероксидами; промежуточный продукт в реакциях восстановления флавинов с O_2	Индукция ПОЛ, цитотоксическое действие, образование пероксида водорода и супероксидного анион-радикала при взаимодействии с органическими молекулами	Аскорбиновая кислота, мочева кислота, убихинон, α -токоферол
Пероксид водорода H_2O_2 , стабилен	Двухэлектронное восстановление кислорода ксантиноксидазой и флавиновыми оксидазами; реакция дисмутации O_2^- с участием или без участия супероксиддисмутазы	Цитотоксическое действие, образование гидроксильного радикала в реакциях типа Фентоновской, локальное закисление среды, сосудосуживающее действие, ингибирование пролиферации лимфоцитов	Внутриклеточные каталаза и глутатионпероксидазы, церулоплазмин
Гидроксильный радикал OH^+ ; 10^{-9} с; < 10 нм	Разложение пероксида водорода ионами металлов переменной валентности (реакция Фентона); действие ионизирующих излучений на воду; образование при микросомальном окислении; при взаимодействии с O_2^-	Сильный окислитель, индуцирующий разрыв СН-связей; индукция ПОЛ; вызывает повреждение молекул белков и нуклеиновых кислот; оказывает сильное цитотоксическое, мутагенное и канцерогенное действия	Одно- и многоатомные спирты, аскорбиновая кислота, мочева кислота, тиомочевина, урацил, диметилсульфоксид

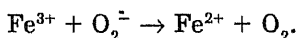
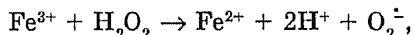
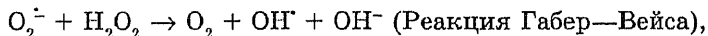
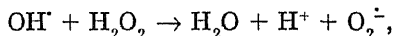
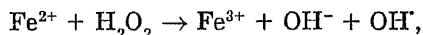
1	2	3	4
Синглетный кислород 1O_2 ; 10^{-6} с; 0,3 мкм	Фотоиндуцированные реакции, сопутствующий продукт в реакциях с пероксидазами; образуется при спонтанной дисмутации супероксидного анион-радикала	Индукция ПОЛ, вызывает повреждения молекул белков и нуклеиновых кислот; оказывает цитотоксическое и мутагенное действие	Акцепторы и тушители: каротиноиды, азиды, амиды, α -токоферол, алкены, производные фурана, ароматические углеводороды, холестерин, гистидин, аскорбиновая и мочевая кислоты
Гипогалоиды $OSCl^- \leftrightarrow HOCl$ $OBr^- \leftrightarrow HOBr$ $OJ^- \leftrightarrow HOJ$	Реакция пероксида водорода с миелопероксидазой лейкоцитов и пероксидазой эозинофилов	Индукция и ингибирование ПОЛ, инактивация ингибиторов протеаз; цитотоксическое действие	Церулоплазмин, мочевая кислота, альбумин, аминокислоты (аланин, серин, валин, глицин)
Пероксидный радикал $RO_2^{\cdot}$; 10 с	Взаимодействие кислорода с органическими радикалами; реакции супероксидного анион-радикала, синглетного кислорода, гидроксильного радикала, алкоксильного радикала с ненасыщенными жирными кислотами липидов	Образование алкильных радикалов липидов и гидропероксидов	α -токоферол, убихинон, аскорбиновая кислота, мочевая кислота
Алкоксильный радикал $RO^{\cdot}$; 10^{-6} с	Разложение органических пероксидов ионами металлов переменной валентности	Индукция ПОЛ; цитотоксическое и канцерогенное действия	Аскорбиновая кислота, убихинон, α -токоферол, мочевая кислота

Супероксидный анион-радикал образуется путем одноэлектронного восстановления кислорода или одноэлектронного окисления пероксида водорода. Мембраны фагоцитирующих клеток — тканевых макрофагов, моноцитов и гранулоцитов крови — содержат ферментный комплекс — NADPH-оксидазу, которая окисляет NADPH до NAD^+ , при этом происходит одноэлектронное восстановление молекулярного кислорода до супероксид-радикала. Супероксидный анион-радикал является важным фактором токсического действия кислорода, обладает высокой реакционной способностью по отношению к различным компонентам биосистем. Предполагают, что $O_2^{\cdot-}$ либо атакует ДНК непосредственно, либо приводит к образованию вторичных радикалов,

воздействующих на ДНК. Супероксидный радикал может вызывать деполимеризацию кислых полисахаридов, а также инициировать ПОЛ. При нормальном протекании метаболических процессов $O_2^{\cdot -}$ не накапливается в клетках в результате его обезвреживания супероксиддисмутазой. Однако он плохо проникает через клеточную мембрану и оказывает токсическое действие в условиях интенсивного образования свободных радикалов и снижения активности антиоксидантных систем клетки.

Пероксид водорода — наиболее стабильный интермедиат восстановления кислорода — способен покидать клетку как более гидрофобное соединение по сравнению с $O_2^{\cdot -}$. Он наименее реакционноспособен и наиболее легко определяется. H_2O_2 можно получить прямым двухэлектронным восстановлением O_2 с последующей дисмутацией $O_2^{\cdot -}$. Пероксид водорода токсичен, вызывает окисление сульфгидрильных соединений и метионильных остатков белков, а также пероксидное окисление полиненасыщенных жирных кислот.

Супероксидный анион-радикал и пероксид водорода способны генерировать чрезвычайно активный окислитель — гидроксильный радикал в следующей цепной реакции:



Смесь солей железа с пероксидом водорода называется реактивом Фентона и широко используется как гидроксилирующий агент. Гидроксильный радикал образуется и при радиоллизе воды, что лежит в основе повреждающего действия ионизирующего излучения на биосистемы. Гидроксильный радикал повреждает нуклеиновые кислоты, оказывая как мутационное, так и летальное действие на клетку, инициирует реакции ПОЛ, инактивирует ферменты, т.е. обладает сильнейшим цитотоксическим действием.

Супероксидный анион-радикал, пероксид водорода и пергидроксильный радикал способны генерировать синглетный кислород. Он отличается от других активных форм кислорода тем, что для его получения требуется лишь поглощение энергии без

химической модификации кислородных молекул. Следует подчеркнуть, что основное состояние молекул O_2 является триплетным, однако при поглощении энергии молекулы кислорода способны заселять относительно низколежащие синглетные уровни $^1\Sigma_{g+}$ и $^1\Delta_g$. Для заселения $^1\Sigma_{g+}$ необходима энергия, соответствующая фотонам с $\lambda = 760$ нм, для заселения $^1\Delta_g$ — с $\lambda = 1270$ нм. В состоянии $^1\Sigma_{g+}$ неспаренные электроны находятся на различных орбиталях и пространственно разделены: $(\uparrow\downarrow)$.

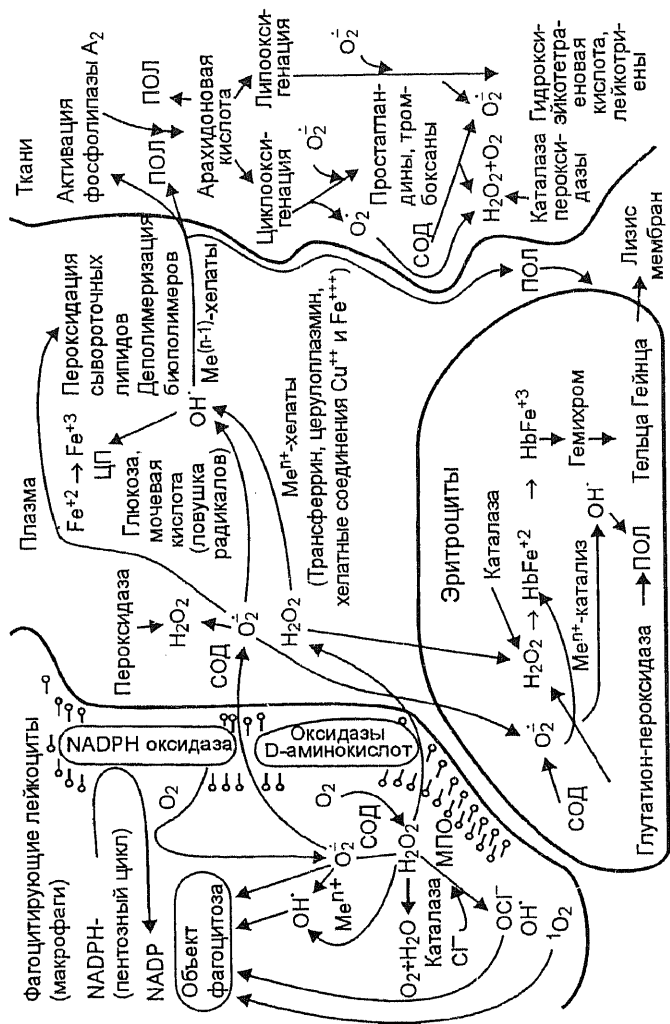
В $^1\Delta_g$ -состоянии занята одна и та же орбиталь: $(\uparrow\uparrow -)$.

Таким образом, синглетным кислородом называют электронно-возбужденное состояние молекулы O_2 , находящейся на одном из указанных синглетных уровней. Одним из самых эффективных механизмов образования 1O_2 является, по-видимому, процесс его генерации в результате переноса энергии на кислород от триплетных молекул различных соединений. Этот механизм определяет фотосенсибилизированное образование синглетного кислорода в растворах разнообразных сенсibilизаторов в аэробных условиях.

В ходе миелопероксидазной реакции пероксид водорода ферментативно превращается в гипохлорит-анион, который является активной формой хлора и представляет собой мощный окислитель. В присутствии ионов железа он способен превращаться в $OH^\cdot$. Миелопероксидазная реакция осуществляется в макрофагах и необходима для борьбы с инфекциями и устранения повреждения клеток. Макрофаги мигрируют в очаг воспаления, где генерируют супероксидный анион-радикал и синглетный кислород за счет NADPH-оксидазной реакции, пероксид водорода с помощью супероксиддисмутазы и гипохлорит-анион OCl^- (рис. 28).

NO-радикал ($NO^\cdot$) вырабатывается ферментативно NO-синтазой фагоцитов и гладкомышечных клеток сосудов и выполняет роль расслабляющего фактора для гладких мышц вследствие активации гуанилатциклазы. Это соединение рассматривают как вторичный мессенджер вследствие контролируемого способа образования, высокой скорости проникновения через клеточную мембрану и длительного времени жизни (несколько секунд)*. В клетке $NO^\cdot$ взаимодействует с низкомолекулярными тиолами, образуя моно- и динитрозильные комплексы, токсичные для клетки. Мононитрозоглутатион может вызывать программируемую гибель клетки — апоптоз.

* За открытие роли оксида азота как сигнальной молекулы в сердечно-сосудистой системе Р. Фурчготту, Л. Игнарро и Ф. Мьюраду в 1998 г. присуждена Нобелевская премия.



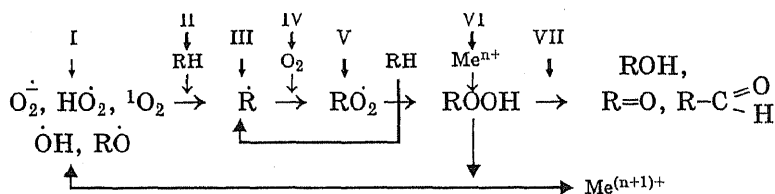
АКМ называют также *прооксидантами*, т.е. веществами, усиливающими разветвление цепи окисления в результате взаимодействия с гидроксипероксидами биомолекул. Постоянное образование прооксидантов в живых организмах находится в равновесии с их дезактивацией антиоксидантами, что лежит в основе внутриклеточного механизма регуляции метаболических процессов — *редокс-регуляции*. Сдвиг баланса антиоксидантов и прооксидантов в тканях в сторону прооксидантов называют *окислительным стрессом*. Следствием окислительного (оксидативного) стресса является окислительное повреждение тканей, которое сопровождается различными патологическими состояниями (более 60 болезней) — различные воспаления, ревматоидный артрит, гастрит, язва, колит, цистит, бронхолегочные заболевания, канцерогенез, сахарный диабет, атеросклероз, старение, нейродегенеративные процессы (паркинсонизм, болезнь Альцгеймера) и др. Однако до недавнего времени рассматривалась преимущественно патогенная функция АФК, реализующаяся посредством активации ПОЛ в мембранах. Исследования последних лет выявили участие АКМ в регуляции тонуса сосудов, клеточной пролиферации, синтезе простагландинов, микробцидном действии фагоцитов, регуляции метаболических процессов в качестве внутриклеточных мессенджеров, индукции иммунных реакций. Поэтому сейчас весьма актуальным является вопрос о соотношении положительной и отрицательной роли АФК в осуществлении и регулировании клеточного метаболизма, а также о регулировании динамического равновесия про- и антиоксидантов и о целесообразности ингибирования синтеза АФК в определенных условиях.

Патологические состояния возникают при чрезмерном накоплении АКМ и интенсификации оксидативной модификации макромолекул. В качестве факторов, индуцирующих оксидативный стресс, выделяют избыток O_2 (особенно при гипербарической оксигенации и реперфузии), сильные воспалительные процессы с активацией нейтрофилов и макрофагов, ионизирующее и УФ-излучение, избыток гема, Fe^{2+} , действие ксенобиотиков, больших доз витаминов А и D. АФК в высоких концентрациях вызывают мутации, ингибирование синтеза ДНК и деления клеток, способны активировать апоптоз. В результате оксидативной модификации белков происходят нарушение их структурного состояния и функциональных свойств, агрегация и денатурация их моле-

кул. Продукты ПОЛ проявляют мутагенный и цитотоксический эффекты. Кроме того, избыток некоторых эйкозаноидов индуцирует тромбоз и гипертонию (тромбоксаны), гиперчувствительность, участие в развитии инфаркта миокарда, язвы желудка, бронхиальной астмы (лейкотриены).

3.3. ПУТИ РЕГУЛИРОВАНИЯ УРОВНЯ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ И АКТИВНЫХ КИСЛОРОДНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

Регулирование уровня активных кислородных метаболитов и свободнорадикальных продуктов ПОЛ осуществляется *антиоксидантными системами*, снижающими активность радикальных окислительных процессов. В настоящее время под антиоксидантами понимают широкий класс соединений, ингибирующих окислительные процессы по одному или нескольким механизмам:



Различают превентивные антиоксиданты (пути: II — изменение структурной организации субстрата, замедляющее окисление; IV — снижение концентрации O_2 ; VI — связывание или окисление ионов металлов переменной валентности, индуцирующих разложение пероксидов и образование радикалов; VII — перевод пероксидов в стабильные продукты окисления: спирты, альдегиды, кетоны) и ингибиторы АКМ (пути: I — ингибирование радикальных форм АКМ, способных инициировать образование органических радикалов; III и V — прерывание окислительной цепи посредством взаимодействия с органическими радикалами). Действие ингибиторов АКМ является специфичным.

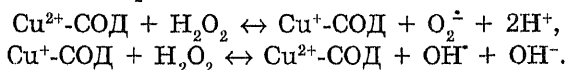
Часто антиоксиданты классифицируют в соответствии с величинами их молекулярных масс. К группе высокомолекулярных соединений — ферментов антиоксидантной защиты и белков, связывающих катализаторы свободнорадикальных процессов — ионы Fe и Cu, относят соответственно супероксиддисмутазу (СОД), церулоплазмин, пероксидазу, каталазу, глутатионзави-

симые ферменты и альбумин крови, трансферрин, ферритин. Группу низкомолекулярных антиоксидантов составляют α -токоферол, аскорбат, глутатион, мочева кислота, мочеина, билирубин, некоторые аминокислоты.

Ферментативные антиоксиданты (АО) характеризуются высокой специфичностью действия, а также клеточной и органной локализации, использованием в качестве катализаторов некоторых металлов (Cu, Zn, Fe, Se). Уровень внутриклеточных ферментативных АО находится под генетическим контролем. У животных в условиях гипоксии и гипероксии, усиливающих образование АКМ, повышается уровень внутриклеточных ферментативных АО, что связано с механизмами поддержания устойчивости организмов к окислительному стрессу.

Супероксиддисмутаза (КФ 1.15.1.11, СОД) катализирует реакцию дисмутации супероксидного анион-радикала: $2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. Обнаружено несколько изоферментов этого белка, различающихся локализацией, строением активного центра и некоторыми физико-химическими свойствами. Cu, Zn-содержащая СОД чувствительна к цианиду и содержится в цитозоле и в межмембранном пространстве клеток эукариот. Цианидрезистентная Mn-СОД (железосодержащий изофермент) локализована в митохондриях эукариот и найдена у прокариот. В плазме содержится цианидчувствительная экстрацеллюлярная СОД, представляющая собой Cu, Zn-содержащую тетрамерную молекулу (Mr ~ 120—135 кДа) из четырех гликопротеиновых субъединиц. Предполагают, что экстрацеллюлярная СОД выполняет функцию защиты клеток эндотелия во всем организме. Однако активность СОД в плазме крови намного ниже, чем для цитозольного фермента. По-видимому, это связано с накоплением конечного продукта реакции — пероксида водорода, являющегося ингибитором фермента. В клетках пероксид водорода быстро разрушается внутриклеточными каталазой и глутатионпероксидазой.

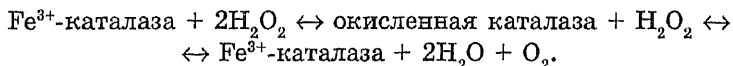
Несмотря на высокую специфичность фермента, в определенных условиях Cu-СОД может взаимодействовать с пероксидом водорода и выступать в качестве прооксиданта, инициируя образование радикалов $O_2^{\cdot -}$ и $OH^{\cdot}$:



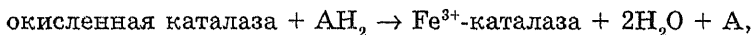
В настоящее время исследуются возможности клинического применения СОД, обладающей выраженным защитным эффек-

том при воспалительных, ишемических и стрессовых поражениях. С целью повышения стабильности фермента и предотвращения его быстрого разрушения во внеклеточном пространстве используют препараты фермента, ковалентно связанного с иммуноглобулинами, сывороточным альбумином, полиэтиленгликолем.

Каталаза (КФ 1.11.1.6) ускоряет процесс двухэлектронного восстановления пероксида водорода до воды, используя H_2O_2 как донор электрона. Молекула каталазы состоит из четырех идентичных субъединиц и четырех групп гематина. Молекулярная масса фермента из различных источников составляет 225—250 кДа. Каталаза локализована преимущественно в пероксисомах клеток, где ее концентрация достигает $\sim 10^{-6}$ моль/л. Максимальное содержание фермента обнаружено в эритроцитах, печени и почках. Разложение пероксида водорода каталазой осуществляется в два этапа:



В окисленном состоянии каталаза работает и как пероксидаза, катализируя реакции окисления спиртов или альдегидов:



где АН_2 — донор электронов.

Церулоплазмин — один из основных антиоксидантов плазмы, проявляющий как специфическую, так и неспецифическую антиоксидантную активность. Специфическая активность, связанная со снижением уровня АКМ, обусловлена реализацией трех возможных механизмов: 1) церулоплазмин обладает феррооксидазной активностью, окисляя ионы Fe^{2+} без образования супероксидного анион-радикала; 2) он способен вызывать дисмутацию супероксидных радикалов, которая имеет не ферментативный, а стехиометрический характер (это обуславливает ингибирование церулоплазмином ПОЛ в липопroteинах); 3) церулоплазмин инактивирует АФК, генерируемые миелопероксидазой, и тем самым защищает антипротеиназу от окислительного повреждения гипохлоритом.

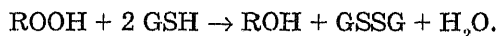
Неспецифическая антиоксидантная активность церулоплазмينا связана с образованием комплексных соединений с медью, что препятствует возможности их участия в реакциях Фентона и Габер—Вейса.

Антиоксидантной активностью обладает также трансферрин

плазмы. Его действие носит в основном неспецифический характер, обусловленный связыванием ионов железа. При насыщении железом белка до 100 % трансферрин может проявлять прооксидантное действие, связанное с генерацией гидроксильных радикалов. Избыток железа при полном насыщении трансферрина связывается неспецифически с поверхностью белка и в такой форме может участвовать в реакции Габер—Вейса.

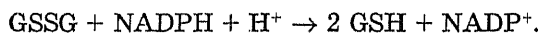
К группе высокомолекулярных антиоксидантов относятся глутатионзависимые ферменты — глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, глутатионтрансфераза.

Глутатионпероксидаза (КФ 1.11.1.9) эффективно утилизирует токсичные липопероксиды в организме при помощи ферментативной реакции



В тканях млекопитающих обнаружены по крайней мере два фермента, способные легко восстанавливать органические гидропероксиды. Селенсодержащая глутатионпероксидаза с высокой скоростью утилизирует как пероксид водорода, так и органические гидропероксиды, в том числе липопероксиды — пероксиды жирных кислот, ацилглицеридов, стероидов и простагландинов. Неселеновая глутатионпероксидаза II, напротив, активно восстанавливает исключительно органические гидропероксиды. Se-содержащая глутатионпероксидаза локализована в цитозоле (~70 %) и митохондриях (20—30 %) клеток млекопитающих.

В регуляции обмена липопероксидов (рис. 29) важную роль играет сопряженное действие глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы (КФ 1.6.4.1), приводящее к инактивации пероксидов жирных кислот и превращению их в соответствующие оксикислоты. Глутатионредуктаза катализирует восстановление окисленного глутатиона:



Глутатионтрансферазы (КФ 2.5.1.18) представляют собой группу ферментов, катализирующих начальную стадию биосинтеза меркаптуратов — конъюгацию глутатиона с ксенобиотиками (RX), содержащими электрофильный атом:



Однако продуктом ферментативного превращения некоторых субстратов, в том числе органических гидропероксидов, является не тиоэфир (RSG), а окисленный глутатион. Образование GSSG

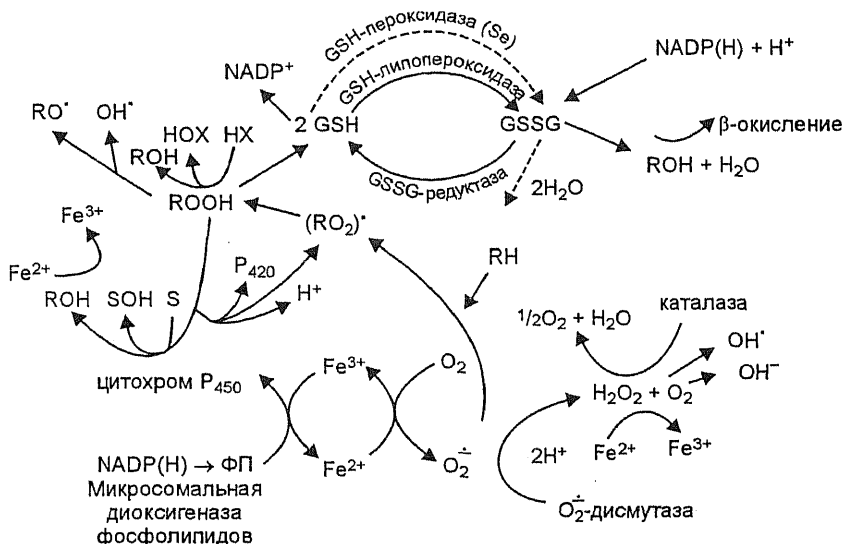
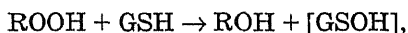
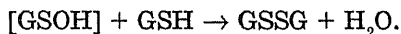


Рис. 29. Детоксикация супероксидного радикала, пероксида водорода и липопероксидов в тканях млекопитающих

при действии GSH-трансферазы на органические гидропероксиды объясняется взаимодействием электрофильного кислорода с тиолатным анионом (GS^-), что приводит к возникновению нестабильного сульфенового производного глутатиона:



которое затем неферментативно реагирует с еще одной молекулой GSH:

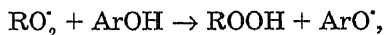
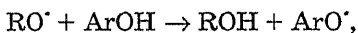


Глутатионтрансферазы локализованы преимущественно в цитозоле клеток; в печени человека они составляют 2—4 % от общего количества цитозольного белка. Глутатионтрансферазы эффективно восстанавливают гидрофобные гидропероксиды с большим объемом молекулы (гидропероксиды линолевой и арахидоновой полиненасыщенных жирных кислот, фосфолипидов), а также гидропероксиды мононуклеотидов и ДНК, участвуя тем самым в их репарации.

Считают, что при окислительном стрессе ферментативная антиоксидантная защита оказывается малоэффективной по сравнению с действием низкомолекулярных соединений. Это связа-

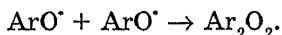
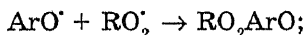
но с тем, что ферменты-антиоксиданты локализованы внутри клеток, а в биологических жидкостях обнаруживаются лишь следовые их количества. Кроме того, при оксидативном повреждении происходит быстрая инактивация конститутивного пула ферментов свободными радикалами. Поэтому необходимо значительное время для индукции их синтеза. В этих условиях повышается роль низкомолекулярных антиоксидантов, не только снижающих интенсивность свободнорадикальных процессов, но и выполняющих важные метаболические функции.

Эффективными перехватчиками свободных радикалов являются фенольные антиоксиданты, содержащие ароматическое кольцо, связанное с одной или несколькими гидроксильными группами. Благодаря наличию в структуре ароматического кольца обобщенной системы π -электронов происходит смещение отрицательного заряда на кислород, в результате которого осуществляется достаточно легкий отрыв атома водорода ОН-группы с образованием разных изомерных форм фенокси-радикала. Такие соединения выступают в качестве перехватчиков пероксидных и алкоксильных радикалов в следующих реакциях:

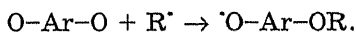


где $ArOH$ — ароматическое кольцо фенольного антиоксиданта, связанное с гидроксильной группой.

Взаимодействие фенольных антиоксидантов с органическими радикалами приводит к образованию феноксильных радикалов ($ArO^{\cdot}$), которые могут участвовать в реакциях диспропорционирования с образованием хинолидных пероксидов:



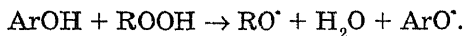
Распад хинолидных пероксидов приводит к образованию хинонных форм молекул, которые в нормальных условиях не обладают антиоксидантными свойствами, однако при дефиците кислорода могут тормозить окисление путем взаимодействия с алкильными радикалами:



К фенольным соединениям, обладающим выраженной антиоксидантной активностью, относят витамины Е (α -токоферол) и К, триптофан, тирозин, фенилаланин, убихиноны, каротиноиды,

флавоноиды, фенокарбоксильные кислоты и др. Они ингибируют супероксидный анион-радикал кислорода, синглетный молекулярный кислород, гидроксильный радикал и индуцированные ими процессы ПОЛ.

Вместе с тем благодаря способности легко отдавать и захватывать электроны фенольные АО могут выступать и в качестве восстановителей. Например, в условиях гипоксии при действии ряда дыхательных ядов в митохондриях убихинон окисляется кислородом с образованием супероксидного анион-радикала, т. е. проявляет прооксидантные свойства. α -Токоферол способен восстанавливать ионы металлов переменной валентности и действовать как прооксидант, в частности, при индуцированном ионами железа окислении липосом. Взаимодействие фенольных АО с пероксидами приводит к образованию алкоксильных радикалов, которые могут индуцировать окислительные реакции:



Аскорбиновая кислота способна выступать в качестве донора и акцептора водорода благодаря наличию в ее структуре двух енольных групп. Аскорбат образуется у животных в виде конечного продукта из разветвлений глюкуронатного пути обмена глюкозы. При окислении витамина С в тканях животных и человека образуется дегидроаскорбат, превращающийся затем в дикетогulonат. При расщеплении последнего образуется щавелевая кислота, а при декарбоксилировании — ксилулоза, превращающаяся в глюкозу. У растений окисление аскорбата с образованием дегидроаскорбата катализирует медьсодержащая аскорбат-оксидаза. Эту же функцию выполняют и другие терминальные оксидазы растительных и животных тканей — цитохромоксидаза, фенолоксидаза, некоторые металлы. Одновременно с окислением аскорбата в организме происходит ферментативное и неферментативное восстановление дегидроаскорбата до аскорбата, осуществляющееся при участии восстановленного глутатиона. Второй путь быстрого образования аскорбата в организме — восстановление монодегидроаскорбата при участии NADH.

Способность аскорбата и дегидроаскорбата легко подвергаться окислительно-восстановительным превращениям лежит в основе широкого участия витамина С в обмене веществ: дыхании и фотосинтетической активности, транспорте электронов, окислении и восстановлении никотинамидных коферментов.

Аскорбат необходим для нормального развития организма, повышает эффективность адаптации к воздействию факторов внешней среды, участвует в обмене белков, липидов, углеводов, ускоряет процессы регенерации, стимулирует деятельность желез внутренней секреции.

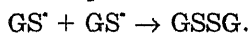
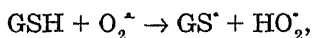
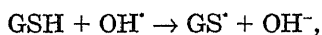
Окисленная и восстановленная формы аскорбата способны проникать через мембранные структуры животных клеток. Благодаря большей липофильности дегидроаскорбат легко диффундирует через биомембраны, чем существенно отличается от аскорбата. Дегидроаскорбат как транспортная форма витамина С проникает в биологические структуры посредством простой или облегченной диффузии. В нормальных физиологических условиях основную роль в процессах трансмембранного переноса и поддержания физиологического уровня аскорбата в клетках играет механизм активного транспорта, опосредованный участием специфических белков и зависящий от наличия энергии.

Аскорбиновая кислота обладает чрезвычайно широким спектром антиоксидантных свойств: обезвреживает гипогалоиды, супероксидный анион-радикал кислорода, пергидроксильный радикал, пероксидный радикал, синглетный кислород, гидроксильный радикал, восстанавливает α -токоферильный радикал, возвращая α -токоферолу антиоксидантные свойства, а также тиильный ($CS^{\cdot}$) и тиопероксильный ($GSO^{\cdot}$) радикалы. Витамин С превосходит другие антиоксиданты плазмы крови в защите липидов от пероксидного окисления, так как только это соединение достаточно реакционноспособно для эффективного ингибирования ПОЛ. Антиоксидантные свойства аскорбата основаны на функционировании одноэлектронных циклических переходов между дигидро-, семидигидро- и дегидроаскорбатными формами. Скорость этих превращений зависит от присутствия металлов переменной валентности, других пар окислитель—восстановитель и величины pH. Способностью непосредственно взаимодействовать с АФК характеризуется восстановленная форма аскорбиновой кислоты.

Витамины С, А, D и F, при окислении и аутоокислении которых образуются промежуточные радикальные формы, могут выполнять роль инициаторов окисления и ускорять ПОЛ, увеличивая скорость зарождения цепей реакций в мембранах. Кроме того, в присутствии ионов железа и меди аскорбиновая кислота становится мощным прооксидантом, что указывает на необходимость *in vivo* надежной секвестрации свободных ионов металлов пере-

менной валентности. Проявление аскорбатом анти- или прооксидантных свойств зависит также от концентрации субстрата и условий протекания окислительных реакций. Такая ее функциональная пластичность необходима для осуществления в биосистемах механизма редокс-регуляции.

Антиоксидантные свойства глутатиона (GSH) — трипептида, образованного цистеином, глутаминовой кислотой и глицином, определяются как непосредственным взаимодействием с АФК и обменными реакциями с дисульфидными связями, так и функционированием глутатионзависимых ферментов (см. выше). Механизм защитного эффекта глутатиона связан с инактивацией высокореакционных кислородных и органических свободных радикалов вследствие переноса атомов водорода с молекулы тиола. Образующиеся активные частицы обладают меньшим повреждающим эффектом по сравнению с радикалом, у которого неспаренный электрон локализован на атоме углерода:



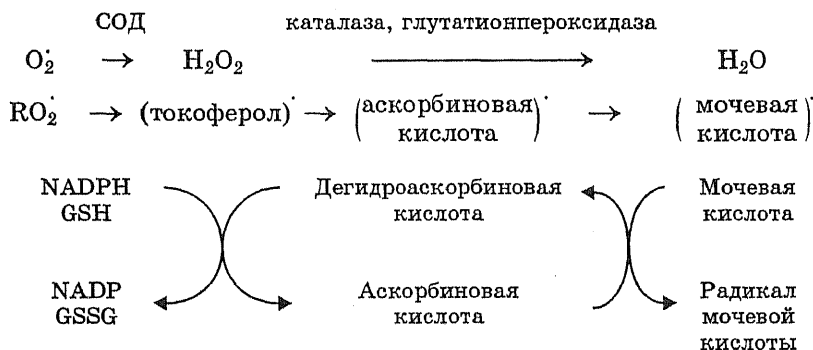
Тиольные радикалы эффективно удаляются из реакционной среды вследствие образования дисульфидов глутатиона.

Глутатион необходим для нормального функционирования эритроцитов и кроветворной ткани, в норме он практически весь ассоциирован с форменными элементами крови и находится в восстановленной форме (до 96 %). GSH участвует в восстановлении метгемоглобина. Ферменты синтеза глутатиона находятся в эритроцитах. Процесс восстановления его происходит с участием глутатионредуктазы, а также NADPH и зависит от активности пентозофосфатного пути. Клеточный глутатион участвует в поддержании пула восстановленного аскорбата: перенос восстановленных эквивалентов с GSH на аскорбат осуществляется глутатиондегидроаскорбатредуктазой.

Мочевая кислота по своим свойствам близка к енольным антиоксидантам и может выступать синергистом с радикалами α -токоферола и аскорбиновой кислоты. Она способна инактивировать синглетный кислород, гидроксильный радикал, связывать ионы железа с участием аминогрупп, ингибировать ПОЛ и восстанавливать метгемоглобин с образованием радикала урата.

Разные группы антиоксидантов функционируют в тесной вза-

имосвязи: снижение концентрации или активности одних компонентов антиокислительных систем приводит к изменению уровня других, что обеспечивает поддержание окислительно-восстановительного гомеостаза клеток. Антиоксидантные ферменты и низкомолекулярные соединения катализируют последовательные этапы превращения АФК, например:



Высказано представление об антиоксидантных цепях переноса электронов, эффективность функционирования которых обеспечивается работой всех компонентов антиокислительных систем.

Антиоксиданты, модифицируя структуру и функциональную активность мембран, оказывают воздействие на клеточный метаболизм различными способами: в результате взаимодействия со свободными радикалами, рецепторами, путем ингибирования и активирования ферментов, непосредственного встраивания в мембрану, взаимодействия с генетическим аппаратом клетки (рис. 30).

Необходимо отметить, что выяснение множественных механизмов действия антиоксидантов в организме, включающих и воздействие их на скорость ПОЛ, и влияние на различные процессы клеточного метаболизма, представляет сложную научную задачу. Это связано с проявлением ими активности в широком интервале концентраций (10^{-18} — 10^{-2} моль/л) и реализацией в каждом интервале концентраций различных механизмов:

- протеканием реакций ингибиторов со свободными радикалами;
- взаимодействием с клеточными рецепторами;
- изменением текучести липидов мембран и мезофазных переходов в них;

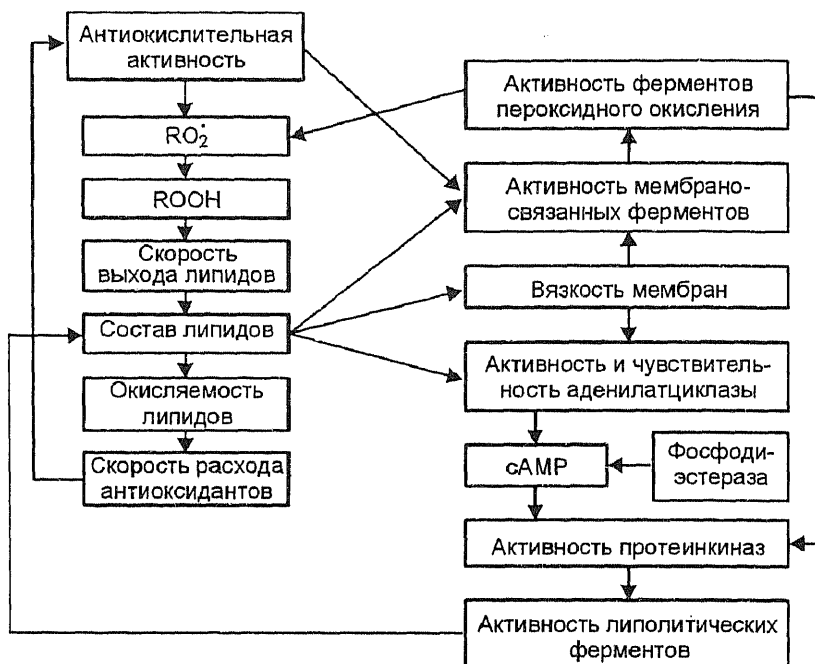


Рис. 30. Схема процессов регуляции клеточного метаболизма с участием окислительных реакций в липидах мембран (К. Е. Круглякова, Л. Н. Шишкина, 1992)

- непосредственным влиянием на активность ферментов;
- влиянием на лиганд-белковые отношения через параметрический резонанс.

Переход от одного механизма к другому обуславливает сложную немонотонную, полимодальную зависимость "доза—эффект" (Е. Б. Бурлакова, 1998).

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Опишите основные механизмы модификации белковых и липидных компонентов биомембран при воздействии экстремальных факторов внешней среды и развитии патологических состояний организма.
2. Что такое пероксидное окисление липидов, какие факторы инициируют этот процесс, какова последовательность стадий его развития?
3. В чем состоит сущность цепного окисления липидов?
4. В чем разница между ферментативным и неферментативным пероксидным окислением липидов?

5. Что такое активные формы кислорода, какова их роль в развитии различных патологических состояний организма?

6. Каковы механизмы образования различных активных форм кислорода?

7. Опишите свойства и пути утилизации супероксидного анион-радикала и пероксида водорода.

8. В чем отличие синглетного молекулярного кислорода от других активных кислородных метаболитов?

9. Какова роль NO-радикала в регулировании процессов клеточного метаболизма?

10. Что называют оксидативной модификацией макромолекул и окислительным стрессом?

11. Дайте определение понятия "антиоксиданты".

12. Каковы основные механизмы ингибирования антиоксидантами окислительных процессов?

13. Охарактеризуйте основные компоненты системы высокомолекулярных антиоксидантов.

14. Какова роль глутатионзависимых ферментов в регулировании уровня свободнорадикальных продуктов ПОЛ и активных кислородных метаболитов?

15. В чем отличия прооксидантов от антиоксидантов?

16. Опишите свойства, механизмы действия и метаболические функции основных низкомолекулярных компонентов антиоксидантной системы.

17. Обоснуйте утверждение: "Биомембраны — неперенные участники совокупности процессов возникновения и развития ряда патологических состояний организма человека".

Глава 4

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МОДИФИКАЦИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПОНЕНТОВ БИОМЕМБРАН ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ АГЕНТОВ

4.1. ФОТОХИМИЧЕСКИЕ И РАДИАЦИОННО- ХИМИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ КОМПОНЕНТОВ БИОМЕМБРАН В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ

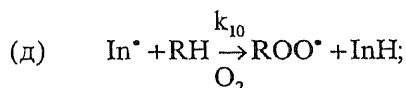
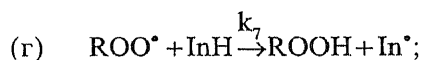
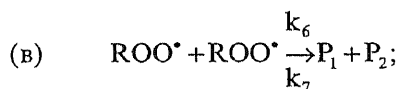
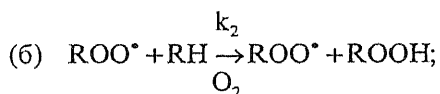
4.1.1. Структурно-функциональные модификации молекулярных компонентов биомембран под действием УФ-излучения

Биологически значимое УФ-излучение занимает участок спектра от 200 до 400 нм и подразделяется на три области: коротковолновую (200—280 нм), средневолновую (280—315 нм) и длинноволновую (315—400 нм). Поверхности Земли достигает УФ-свет в диапазоне длин волн 287—400 нм с энергией квантов ~3—4 эВ. Коротковолновая часть спектра УФ-излучения Солнца полностью поглощается озоновым слоем атмосферы.

В биосистемах УФ-свет индуцирует главным образом фотодеструктивные реакции, связанные с фотохимическими превращениями белков и нуклеиновых кислот, относящихся к основным акцепторам УФ-излучения в клетке. Однако в биомембранах и других липидных системах под действием УФ-излучения эффективно протекает процесс пероксидного фотоокисления (ПФО) ненасыщенных жирных кислот липидов, который приводит к значительным изменениям структурно-функционального состояния всех мембранных компонентов. Таким образом, биомембраны содержат различные хромофорные группы, поглощающие энергию УФ-излучения в разных диапазонах длин волн, — ароматические и серосодержащие аминокислоты мембраносвязанных белков, полиненасыщенные жирные кислоты липидов, а также коферменты, включающие пиридиннуклеотиды, флавины, кофермент Q, железопорфирины, витамины.

Результаты исследования фотохимического действия оптического излучения на биомембраны клеток показывают, что наиболее эффективным является УФ-излучение с длинами волн ко-

роче 300 нм. Главный путь фотолиза мембранных липидов — фотоокисление цепей полиненасыщенных жирных кислот фосфолипидов. Следует отметить, что липиды поглощают УФ-свет в коротковолновой области спектра ($\lambda < 240$ нм), а максимумы поглощения ненасыщенных жирных кислот находятся в области < 220 нм. Однако фотоокисление липидов развивается при воздействии на мембраны более длинноволнового излучения, что обусловлено поглощением УФ-света гидропероксидами липидов, присутствующими в норме в липидных системах вследствие протекания ферментативных процессов ПОЛ (см. главу 3). Диеновые гидропероксиды жирных кислот имеют максимум светопоглощения при ~ 233 нм, а триеновые гидропероксиды — при ~ 270 нм. Процесс ПФО липидов можно представить в общей форме в виде совокупности элементарных реакций:



В этой схеме RH, ROOH, ROO $^\bullet$, InH и In $^\bullet$ обозначают соответственно окисляющийся липид, его гидропероксид, пероксидный свободный радикал липида, антиоксидант и свободный радикал антиоксиданта; P $_1$, P $_2$, Pa — некоторые продукты реакций; k $_0$, k $_2$ и др. — константы скоростей реакций. Реакции (a) и (e) — фотохимические, реакции (б)—(д) — темновые. Реакция (a) носит название реакции фотоиницирования, если ROOH — предше-

ствующие гидропероксиды, или разветвление цепей окисления, (б), (в), (г), (д) — соответственно продолжение цепи, “квадратичный” обрыв цепи (диспропорционирование радикалов $\text{ROO}^\cdot$), “линейный” обрыв цепи на антиоксиданте, инициирование цепи окисления свободным радикалом антиоксиданта. УФ-облучение мембран и других липидных систем индуцирует темновое пероксидное окисление ненасыщенных жирных кислот липидов. Процесс автоокисления в облученных мембранах протекает гораздо медленнее фотоокисления, но за длительный темновой период он может приводить даже к более сильному окислению мембранных липидов, чем фотоокисление. Темновое автоокисление липидов в облученных мембранах блокируется антиоксидантами в низких концентрациях. Под действием УФ-излучения в некоторых клетках стимулируется темновое ферментативное пероксидное окисление липидов с участием циклооксигеназы, в результате которого образуются простагландины. Это явление обнаружено в коже и играет важную роль в развитии эритемной реакции в ответ на УФ-облучение.

Следует подчеркнуть, что процесс пероксидного фотоокисления липидов (ПФОЛ) является двухквантовым и протекает по сложному механизму. Первая фотохимическая стадия его — генерация гидропероксидов в результате присоединения кислорода; вторая стадия, не зависящая от присутствия кислорода, — фотолиз гидропероксидов до вторичных продуктов (альдегидов и кетонов), поглощающих УФ-излучение в диапазоне длин волн 260—280 нм. При воздействии видимого света и длинноволнового УФ-излучения процесс заканчивается в основном на стадии образования гидропероксидов, а при облучении липидных систем более коротковолновым светом ($\lambda \sim 233$ нм) накапливается большое количество вторичных продуктов.

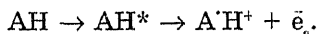
Один из вторичных продуктов ПФОЛ — малоновый диальдегид — при взаимодействии с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) дает окрашенное соединение, поглощающее свет с длиной волны ~ 533 нм. Эту реакцию используют для определения уровня интенсивности протекания ПФОЛ. Второй подход, позволяющий судить об эффективности пероксидного окисления липидов, связан с регистрацией хемилюминесценции, являющейся следствием реакции диспропорционирования пероксидных радикалов липидов.

Каково же значение пероксидного окисления липидов в фотоповреждении биологических мембран? Фотолиз липидов мо-

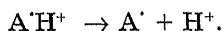
жет приводить прежде всего к существенным нарушениям структурной организации компонентов биомембран. Продукты фотоокисления липидов обладают достаточно выраженными токсическими свойствами. Пероксиды липидов и продукты их дальнейших превращений (альдегиды и кетоны) могут индуцировать повреждение белковых молекул, в частности, их сульфгидрильных групп. Повреждение белков может быть обусловлено как их окислением, так и образованием стабильных ковалентных связей между молекулами белков и продуктами пероксидного фотоокисления липидов. Последние способны инактивировать многие мембраносвязанные ферменты. Кроме того, вышеуказанные продукты окисляют также такие биологически важные соединения, как цистеин, глутатион, нуклеотиды, витамины А и Д, липовую кислоту и др.

Таким образом, действие УФ-излучения приводит к значительным модификациям структурно-функционального состояния компонентов различных мембранных структур и их взаимодействий: изменяется пассивная проницаемость липидного бислоя для ионов, разобщается окислительное фосфорилирование, изменяются конформация и каталитическая активность мембраносвязанных ферментов, нарушаются межклеточные взаимодействия, происходит набухание и лизис клеток и их органелл.

Ряд исследователей считает, что мембранные эффекты УФ-облучения в основном индуцированы ПФОЛ и лишь частично обусловлены фотохимическими превращениями белков. Напомним, что происходящие в белках под воздействием УФ-излучения нарушения их структурно-функционального состояния индуцируются в основном поглощением энергии УФ-света остатками ароматических аминокислот: триптофана, тирозина, фенилаланина, а также остатками серосодержащих аминокислот цистеина и цистина. Под влиянием УФ-света происходит фотоионизация остатков аминокислот с образованием сольватированного электрона и катион-радикала аминокислоты:

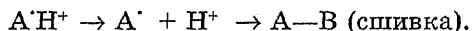


Катион-радикал — сильная кислота и при 77—140 К диссоциирует на протон и нейтральный радикал:

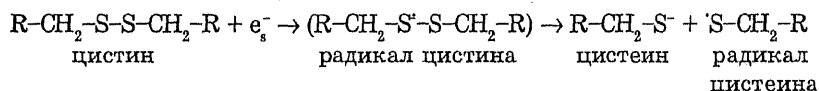


Нейтральные радикалы являются неустойчивыми соединениями и при температуре выше 200 К вступают в дальнейшие пре-

вращения. Взаимодействуя с соседними группами полипептидной цепи, они могут образовывать межмолекулярную сшивку, являющуюся стабильным фотопродуктом:



В присутствии кислорода происходит фотоокисление триптофана, тирозина и фенилаланина. Большое значение в фотохимии белков имеют фотосенсибилизированные реакции с участием сольватированного электрона. Наибольшим сродством к электрону обладают цистин и цистеин. Они быстро разрушаются в результате взаимодействия с сольватированными электронами e_s^- , выбитыми из ароматического кольца:



Если фотолизу подвергается остаток аминокислоты, непосредственно входящей в состав активного центра фермента, уже этого может быть достаточно, чтобы белок потерял ферментативную активность. Если сшивка находится вне активного центра фермента, то она способна изменить баланс водородных, гидрофобных и других слабых связей (множественные разрывы связей), поддерживающих нативную конформацию макромолекулы. В большинстве случаев конечным результатом действия УФ-света на белки является их инактивация, т.е. потеря ферментативной, регуляторной, транспортной, гормональной, иммунологической и других видов активности. Вместе с тем для ряда белков (карбоксипептидаза А, супероксиддисмутаза, цитохром С, гемоглобин) выявлена их активация под влиянием УФ-излучения.

Необходимо отметить, что фоточувствительность мембрано-связанного белка может существенно отличаться от таковой для этого же биополимера в свободном состоянии (в растворе), что обусловлено особенностями микроокружения белковых молекул в мембране, их взаимодействием с другими компонентами надмолекулярного комплекса.

Иными словами, уровень фоточувствительности мембранных белков-ферментов будет эффективно контролироваться структурным состоянием их микроокружения.

Доказательства мембранного контроля УФ-чувствительности ферментов были получены С. В. Коневым и И. Д. Волотовским (1979) на основании анализа изменений величины поперечного

сечения инактивации ацетилхолинэстеразы в свободном состоянии, в составе интактной мембраны, в мембране, обработанной фосфолипазами A_2 , C и D, в мембране, обедненной по холестерину. Под поперечным сечением инактивации (σ) понимают произведение поперечного сечения поглощения (S) активного света и квантового выхода инактивации (ϕ), т. е. $\sigma = S \cdot \phi$. Квантовый выход фотохимической реакции — это отношение числа прореагировавших (химически измененных) молекул к числу молекул, поглотивших фотоны. Следовательно, поперечное сечение поглощения представляет вероятность поглощения кванта света при прохождении его через молекулу. Физический смысл фоточувствительности — вероятность, с которой фотон вызывает химическую реакцию превращения молекулы.

В ходе проведения экспериментов было выявлено, что поперечное сечение инактивации мембраносвязанной эритроцитарной ацетилхолинэстеразы больше, чем у свободного фермента. Нарушение структурного состояния эритроцитарной мембраны с помощью фосфолипаз приводит к уменьшению фоточувствительности ацетилхолинэстеразы. Такой же эффект вызывает и удаление из мембраны значительного количества холестерина, определяющего текучесть липидной фазы мембраны. Влияние мембранного окружения на УФ-чувствительность ацетилхолинэстеразы реализуется, по крайней мере, двумя путями: посредством изменения конформационного состояния фермента за счет межмолекулярных взаимодействий и посредством повреждения белковой молекулы продуктами фотохимических превращений липидов. То есть состояние мембранного фермента зависит не только от эффективности протекания фотохимических процессов в самом белке, но и от фотохимических реакций в “соседних” компонентах, инициирующих структурные перестройки мембраны.

При сравнении кинетики УФ-инактивации свободной и мембраносвязанной ацетилхолинэстеразы обнаружено, что при изучении мембранного фермента наблюдается отклонение от кинетики реакции первого порядка, проявляющееся в искажении линейной зависимости остаточной активности от дозы облучения. Одновременно изменяются и каталитические параметры остаточного фермента.

Необходимо подчеркнуть, что при УФ-облучении свободных ферментов в растворе представлены только активные (немодифицированные) и полностью инактивированные молекулы бел-

ка. Это значит, что при инактивации ферментов в растворе УФ-свет выступает в роли необратимого неконкурентного ингибитора: по мере облучения снижается только максимальная скорость ферментативной реакции, а величина константы Михаэлиса остается неизменной. В отличие от растворимой формы ацетилхолинэстеразы мембраносвязанный фермент фотоинактивируется по типу смешанного ингибирования с одновременным изменением значений максимальной скорости реакции и константы Михаэлиса.

К одной из главных особенностей УФ-повреждения белков в составе биомембран относится так называемый феномен фотохимической аллотопии. Под ним понимают эффект изменения структурно-функционального состояния фермента в составе биомембраны, обусловленный стерическим возмущением его конформации вследствие фотомодификации других структурных компонентов мембраны. Проявление феномена фотохимической аллотопии связывают преимущественно с фотохимическими повреждениями белков, способных под влиянием УФ-света взаимодействовать с соседними мембранными компонентами за счет образования межмолекулярных ковалентных сшивок.

Модификация структуры биомембран с помощью ферментов (например, фосфолипаз, трипсина, нейраминидаз) или в результате дезинтеграции мембраны ультразвуком вызывает исчезновение названного феномена. Следовательно, феномен фотохимической аллотопии характерен только для интактных мембран.

В целом УФ-индуцированные изменения структурно-функционального состояния мембранных белков могут быть обусловлены реализацией нескольких возможных процессов:

- собственными фотопревращениями белка в результате поглощения энергии УФ-излучения его ароматическими и серосодержащими аминокислотными остатками;

- интенсификацией ПФОЛ, накоплением его продуктов (первичных и вторичных), влияющих на конформационное состояние мембраносвязанного белка и его "ближайшего" липидного окружения или способных непосредственно повреждать белковую глобулу;

- поглощением квантов длинноволнового УФ-излучения восстановленными пиридиннуклеотидами, флавинами, железопорфиринами, фотосенсибилизацией ими процессов ПОЛ, а также влиянием их фотохимических продуктов на структуру молеку-

лы белка (фермента), его активного центра и ближайших “соседей” биополимера в мембране.

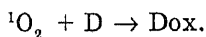
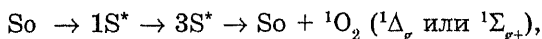
Рассмотрим совокупность фотопроцессов, связанных с поглощением УФ-света хромоформными группами биомембран третьего типа, т.е. различными кофакторами мембранных ферментов. В некоторых случаях в качестве первичных акцепторов энергии излучения выступают вещества, которые передают эту энергию на другие молекулы, а сами при этом обычно не претерпевают химических превращений. Такие вещества называют *фотосенсибилизаторами*, а процессы, в которых они участвуют, — *фотосенсибилизированными*. Фотосенсибилизаторы индуцируют химические реакции, которые в их отсутствие не происходят. Они имеют две системы электронно-возбужденных состояний — синглетную (1S) и триплетную (3S).

Отметим, что пероксидное фотоокисление полиненасыщенных жирных кислот фосфолипидов мембран может происходить при поглощении квантов света как липидом, так и другими молекулами — фотосенсибилизаторами. Фотосенсибилизирующим действием обладают триптофановые и тирозиновые хромофоры белков, порфирины, флавины, пиридиннуклеотиды. Следовательно, ПОЛ может инициироваться не только УФ-излучением, но и видимым светом.

Как правило, фотосенсибилизированное окисление происходит с участием сенсибилизатора в триплетном состоянии, так как оно является более длительным (10^{-4} — 10 с). Поэтому наиболее эффективными являются сенсибилизаторы, образующие долгоживущие триплетные состояния с высоким квантовым выходом. К ним относятся многие синтетические красители (метилевый голубой, бенгальский розовый, эозин), природные пигменты (хлорофилл, гематопорфирин, флавины) и ароматические углеводороды (рубрен, некоторые антрацены). Большинство из них поглощает видимый и длинноволновый УФ-свет, поэтому эти диапазоны длин волн наиболее эффективны при фотосенсибилизированном окислении.

Молекулы сенсибилизатора в триплетном состоянии могут химически взаимодействовать с молекулами субстрата в реакциях переноса электронов или атомов водорода. При переносе электрона на O_2 образуется супероксидный анион-радикал кислорода. При переносе электрона или атома водорода на другие субстраты кислород взаимодействует с короткоживущими проме-

жущими соединениями, образуя продукты фотоокисления. Другой путь фотосенсибилизированных реакций — косвенный: молекула сенсibilизатора в триплетном состоянии химически не участвует в реакции, а передает энергию возбуждения на молекулярный кислород, образуя электронно-возбужденное состояние кислорода — синглетный кислород $^1\text{O}_2$. Активность последнего в окислительных реакциях в 100 раз выше, чем невозбужденного кислорода. Фотопроцессы с участием $^1\text{O}_2$ настолько распространены, что их часто выделяют в особый тип реакций, называемый фотореакциями типа II:



Все остальные реакции по этой классификации относятся к типу I. Оба типа реакций широко распространены. Кроме окисления органических соединений в химических системах, они определяют фотоингибирование фотосинтеза и фотодеструкцию фотосинтетического аппарата при высоких интенсивностях освещения, участвуют в фотоповреждении сетчатки и хрусталика глаза, определяют фототоксичность некоторых лекарственных препаратов, обуславливают фотодеструктивное действие порфиринов при их избыточном накоплении в клетках растений и животных, используются для “разрезания” ДНК, уничтожения вирусов, в фотодинамической терапии раковых заболеваний.

Основная часть изученных фотосенсибилизированных процессов осуществляется с участием кислорода. Фотоповреждение биосистем в присутствии сенсibilизаторов с участием молекулярного кислорода называют фотодинамическим действием. Его рассматривают как частный случай фотосенсибилизированных процессов.

Кислороднезависимых фотосенсибилизированных реакций известно сравнительно мало. В качестве примера можно привести фотолиз цистина в макромолекулах белков при действии УФ-излучения с длинами волн более 280 нм. Фотосенсибилизаторами в этом случае служат ароматические аминокислоты триптофан и тирозин. К кислороднезависимым фотосенсибилизированным процессам относят и фотоприсоединение псораленов к пиримидиновым основаниям ДНК.

Тип фотосенсибилизированной реакции зависит также от природы сенсibilизатора и субстрата, в частности, от их способности вступать в окислительно-восстановительные реакции.

Биомембраны являются основной мишенью повреждающего действия света в присутствии порфириновых соединений, относящихся к эндогенным сенсibilизаторам. Изучение механизмов направленного сенсibilизированного фотоповреждения опухолевых клеток с участием порфиринов, избирательно накапливающихся в них, легло в основу метода фоторадиационной терапии злокачественных новообразований. С другой стороны, в настоящее время необходимо разрабатывать защитные меры от сенсibilизированного фотоповреждения биосистем в присутствии экзогенных соединений (красителей, ароматических углеводов).

Особенности фотосенсibilизированных процессов, протекающих в мембранных системах, определяются чувствительностью липидов и белков к сенсibilизированным фотоповреждениям.

Сенсibilизированному фотоокислению наиболее эффективно подвергаются ненасыщенные жирные кислоты, а также холестерин. Процессы их фотоокисления сходны с таковыми, протекающими при пероксидном окислении липидов. Сенсibilизированное фотоокисление липидов может осуществляться и по реакциям типа II и типа I. Тип реакции фотоокисления различных мембранных структур зависит от соотношения концентраций сенсibilизатор — липид и от способности молекул сенсibilизатора образовывать агрегаты.

Более подробно изучены фотосенсibilизированные повреждения белковых макромолекул с участием синглетного кислорода. Следует подчеркнуть, что $^1\text{O}_2$, с одной стороны, является участником многих фотосенсibilизированных реакций, а с другой — степень его участия в фотопроцессах служит критерием для выявления механизма их протекания.

К настоящему времени установлено, что процесс генерации $^1\text{O}_2$ в результате переноса энергии на кислород от триплетных молекул различных соединений является одним из самых эффективных механизмов образования этой активной формы кислорода. Он определяет фотосенсibilизированное образование $^1\text{O}_2$ в растворах сенсibilизаторов в аэробных условиях, приводит к появлению синглетного кислорода в темновых химических и биохимических реакциях, если они сопровождаются образованием возбужденных молекул органических соединений в синглетном и триплетном состояниях. Кроме того, супероксидный анион-радикал, пероксид водорода, пергидроксильный радикал, образу-

яющиеся в разнообразных ферментативных и неферментативных реакциях, способны генерировать синглетный кислород (см. главу 3). Вероятность фотоиндуцированного образования $^1\text{O}_2$ особенно велика в клетках, содержащих значительное количество поглощающих свет пигментов. Так, эффективными фотосенсибилизаторами образования синглетного молекулярного кислорода являются основные пигменты фотосинтеза (хлорофиллы, бактериохлорофиллы, феофитины), основной пигмент зрения — ретиналь, флавины, порфирины.

Наиболее разработаны в методическом отношении способы обнаружения синглетного кислорода в газовой фазе. Наличие в системе $^1\text{O}_2$ можно зарегистрировать методом эмиссионной спектроскопии. Важным преимуществом этого метода является то, что он позволяет обнаружить $^1\Delta_g$ и $^1\Sigma_g^+$ -состояния синглетного молекулярного кислорода в широком диапазоне давления, тогда как методом ЭПР можно определить $^1\Delta_g$ -состояние синглетного кислорода при давлениях в несколько мм рт. ст. Потенциалы ионизации молекул $^1\text{O}_2$ в состояниях $^1\Delta_g$ и $^1\Sigma_g^+$ ниже, чем для основного состояния $^3\Sigma$. На этом базируется фотоионизационный метод обнаружения возбужденного кислорода. Широкое распространение имеет метод активации реакций путем замены H_2O тяжелой водой. Эффект связан с тем, что время жизни $^1\text{O}_2$ в D_2O значительно больше, чем в H_2O , и поэтому активность синглетного кислорода в D_2O также значительно выше. Современная техника люминесцентных измерений позволяет наблюдать и исследовать инфракрасную люминесценцию синглетного кислорода практически в любых растворителях в ходе фотосенсибилизированных или темновых процессов. Однако регистрация образования синглетного кислорода прямыми методами осложняется из-за низкой его стационарной концентрации вследствие взаимодействия $^1\text{O}_2$ с различными акцепторами и тушителями. Поэтому широкое распространение получили методы обнаружения синглетного кислорода, основанные на применении акцепторов и тушителей, способных эффективно и более или менее избирательно взаимодействовать с синглетным кислородом, приводя к его физической дезактивации или образованию специфических продуктов окисления. В качестве акцепторов $^1\text{O}_2$ применяются алкены, производные фурана, ароматические углеводороды, холестерин; в качестве тушителей — каротиноиды, азиды, амиды, α -токоферол. Возможно самотушение синглетного ($^1\Delta_g$) кислорода

триплетным ($^3\Sigma_g$) кислородом в растворах. Физическое тушение $^1\Sigma_{g+}$ во многом определяется возможностью перехода $^1\Sigma_g \rightarrow ^1\Delta_g$ в колебательном движении молекул тушителя.

Обсуждаются два механизма тушения синглетного кислорода. Во-первых, тушение осуществляется через образование комплекса с переносом заряда, в котором 1O_2 выступает в роли акцептора электрона. Этот комплекс формируется лишь в момент соударения и не находится в равновесии с реагентами. Во-вторых, тушение 1O_2 происходит путем переноса энергии от синглетного кислорода на электронный уровень тушителя при условии непосредственного контакта электронных оболочек 1O_2 и акцептора энергии. При физическом тушении не происходит деструкции тушителя. Химическое тушение приводит к окислению тушителя, накоплению гидропероксидов, образованию свободных радикалов и развитию свободнорадикальных процессов окисления.

В нефотосинтезирующих клетках самыми сильными тушителями 1O_2 являются аминокислоты и белки. Среди аминокислот наиболее эффективны триптофан, гистидин, метионин и цистеин (табл. 12). Для оценки способности соединений взаимодействовать с 1O_2 используют константу скорости тушения, которую рассчитывают по уравнению Штерна—Фольмера на основе измерений тушения люминесценции 1O_2 или ингибирования фотодеструкции акцепторов синглетного кислорода:

$$(\Phi_{ox})_o / (\Phi_{ox})_q = (\Phi_l)_o / (\Phi_l)_q = (\tau_\Delta)_o / (\tau_\Delta)_q = 1 + k_q(\tau_\Delta)_o[Q],$$

где Φ_{ox} — квантовые выходы (или скорости) окисления акцепторов 1O_2 ; Φ_l — квантовые выходы (или интенсивности) люминесценции 1O_2 ; τ_Δ — время жизни 1O_2 ; $[Q]$ — концентрация тушителя; параметры, измеренные в отсутствие тушителя, обозначаются индексом “о”, а в присутствии тушителя — “q”.

Вклад химического тушения в активность аминокислот может составлять от 10 до 100 %. Оно приводит к существенным изменениям структурно-функционального состояния белков. Физическое тушение 1O_2 аминокислотами и белками определяется образованием комплексов с переносом заряда.

Липиды — существенно более слабые тушители 1O_2 по сравнению с белками. Активность фосфолипидов в органических растворителях практически равна сумме активностей составляющих жирных кислот. Ненасыщенные жирные кислоты и холестерин тушат 1O_2 преимущественно по химическому механизму

Таблица 12

*Константы скорости тушения синглетного кислорода
некоторыми биологическими молекулами*

Тушитель	Условия проведения эксперимента	k_q , моль ⁻¹ ·с ⁻¹
Триптофан	D ₂ O, pH 7—8, метод тушения флуоресценции	3,2–5,6 · 10 ⁷
Гистидин	<<	4,0–4,6 · 10 ⁷
Метионин	<<	1,3 · 10 ⁷
L-цистеин	<<	0,9–5 · 10 ⁷
Тирозин	<<	2–5 · 10 ⁶
DL-фенилаланин	<<	7 · 10 ⁵
Глицин	<<	< 10 ⁵
Сывороточный альбумин быка	<<	2,6 · 10 ⁸
Сывороточный альбумин человека	<<	1,7–7,8 · 10 ⁸
Глюкоза	<<	1,4 · 10 ⁴
Сахароза	<<	2,5 · 10 ⁴
Аскорбиновая кислота	<<	0,5–16 · 10 ⁷
Гуанозин	<<	4–6 · 10 ⁶
AMP	<<	4 · 10 ⁴
ATP	<<	3–5 · 10 ⁴
α-токоферол	Растворитель — CCl ₄ , метод тушения флуоресценции	1–7 · 10 ⁸
Хлорофилл а	<<	1–7 · 10 ⁸
Бактериохлорофилл а	<<	10 ⁹
β-каротин	<<	7–8 · 10 ⁹
Яичный фосфатидилхолин	<<	5–10 · 10 ⁴
Фосфатидилхолин сетчатки	<<	10 ⁵
Фосфатидилэтаноламин сетчатки	<<	10 ⁵
Вода	<<	2,8 · 10 ³

с образованием гидропероксидов и далее свободных радикалов, инициирующих ПОЛ. Примечательно, что хлорофиллы, бактериохлорофиллы и порфирины сочетают способность генерировать и тушить ¹O₂ по физическому механизму. Это позволяет указанным пигментам выполнять роль протекторов фотосинтетических мембран от генерируемого ими же синглетного кислорода.

Фотосенсибилизированное окисление аминокислотных остатков белков биомембран является первичным световым процессом. Оно приводит к образованию сшивок полипептидных цепей биополимеров, т. е. к вторичному процессу, не требующему дополнительной световой активации. Различные типы сшивок могут формироваться между фотоокисленными аминокислотными остатками (в основном гистидина) и функциональными группами белков (NH_2 -, SH -).

Фотосенсибилизированные изменения структурного состояния липидов и белков биомембран приводят к существенным нарушениям их функционирования: изменению проницаемости, процессов транспорта, каталитической активности мембранных ферментов (их ингибированию). Степень фотоповреждения мембран зависит от целого ряда факторов: коэффициента распределения сенсибилизатора между мембранной фазой и растворителем, квантового выхода триплетного состояния красителя, его заряда, присутствия про- и антиоксидантов.

В целом совокупность физико-химических процессов, индуцированных воздействием УФ-излучения и приводящих к нарушениям структурно-функционального состояния компонентов мембраны и, в конечном итоге, к изменению протекания метаболических процессов в клетке, может быть представлена в виде следующей схемы (рис. 31).

Изучение молекулярных механизмов действия УФ-излучения на биополимеры, их надмолекулярные комплексы и биомембраны представляет собой одну из актуальных проблем биофизики, биохимии и мембранологии в связи с особой значимостью решения задач в рамках важнейших разделов медицины и экологии. Так, в настоящее время в хирургических, акушерско-гинекологических и терапевтических клиниках широко используется метод аутоотрансфузии УФ-облученной крови (АУФОК). Целесообразность глубокой разработки вопроса о применении этого метода и выявлении механизмов его положительного ("терапевтического") действия была убедительно показана при лечении больных с гнойно-воспалительными и кожными заболеваниями, в случае острых инфекций, заболеваний, связанных с иммунопатологией. Доказана высокая эффективность АУФОК при лечении сосудистых заболеваний нижних конечностей и ишемической болезни сердца. Терапевтический эффект этого метода связывают с усилением оксигенации крови, купированием гипоксичес-

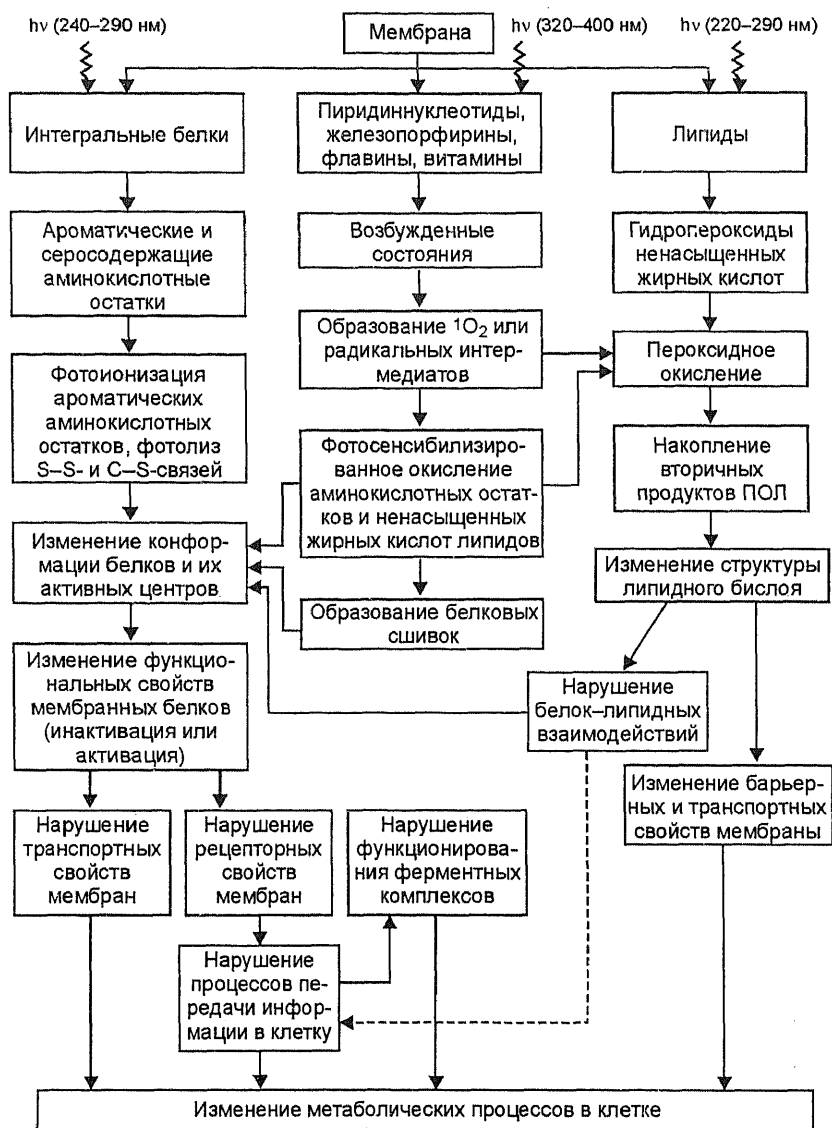


Рис. 31. Схема физико-химических процессов, индуцированных воздействием УФ-излучения и приводящих к нарушениям структурно-функционального состояния компонентов биомембран

ких состояний, с повышением бактерицидных и нормализацией реологических свойств УФ-облученной крови, а также стимуляцией факторов клеточного и гуморального иммунитета. Вместе с тем молекулярные основы формирования клинического эффекта указанного метода исследованы далеко не полностью. Практически не обсуждался вопрос о механизме протекания первичных фотохимических процессов в крови под углом зрения их роли в лечебно-оздоровительном действии АУФОК.

В 1969 г. В. Г. Артюховым был открыт эффект усиления оксигенации молекул гемоглобина мышей под воздействием УФ-света. Последующие исследования клиницистов подтвердили сильнейшее оксигенирующее действие УФ-излучения на кровь. Природа этого явления изучена недостаточно: многие аспекты его нуждаются в детализации, уточнении и конкретизации. Одним из подходов к решению данной задачи является выяснение механизмов действия УФ-излучения на структурно-функциональные свойства важнейших белковых компонентов транспортной, иммунологической, антиоксидантной и окислительной систем крови организма человека и животных.

На кафедре биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета в течение длительного времени проводятся систематические исследования по изучению влияния УФ-радиации на структуру и функции молекул одно- и двухкомпонентных белков (гемоглобина человека и некоторых животных, сывороточного альбумина, каталазы, пероксидазы, цитохрома с, лактатдегидрогеназы, белков системы комплемента) и их комплексов, иммобилизованных ферментов и биомембран в условиях различного микроокружения, в широком диапазоне pH и температур, в присутствии модифицирующих агентов (серотонина, NAD(H), аскорбиновой кислоты, третичного бутанола, маннита, α -токоферола и др.). Определены величины квантовых выходов, констант скоростей, энергии активации и термодинамических параметров реакции фотомодификации белковых молекул.

Установлено, что главной особенностью действия УФ-света на гемопротеиды является фотосенсибилизация остатками ароматических аминокислот простетических групп (гемов) и инициация путем фотомодификации последних локальных конформационных изменений апобелков.

Воздействие УФ-света на растворы супероксиддисмутазы (СОД) индуцирует повышение ее функциональной активности.

Эффект фотоактивации СОД наиболее выражен при экстремальных для проявления ее ферментативной активности значениях рН и определяется конформационным состоянием белковой глобулы.

Инактивация молекул лактатдегидрогеназы (ЛДГ) под влиянием УФ-света обусловлена разворачиванием ее олигомерных молекул. Важную роль в процессах фотопревращений отдельных изоферментов ЛДГ играют активные формы кислорода (синглетный молекулярный кислород, гидроксильный радикал). Реинфузия УФ-облученной крови больным бронхиальной астмой приводит к снижению функциональной активности ЛДГ, что свидетельствует об уменьшении интенсивности окислительных процессов, протекающих в крови пациентов.

Определяющая роль в УФ-индуцированных изменениях гемолитической активности системы комплемента принадлежит опосредованному через продукты радикальной природы (преимущественно продукты пероксидного окисления липидов) действию УФ-света. Отмечено коррегирующее действие АУФОК-терапии на структурно-функциональное состояние эритроцитарных мембран и систему комплемента крови больных бронхиальной астмой и язвой желудка.

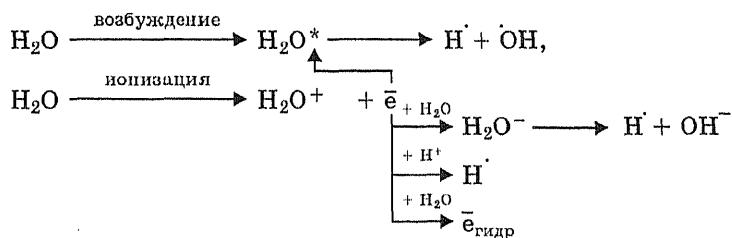
Исследование уровня функциональных свойств и структурного состояния важнейших ферментов транспортной, иммунологической, антиоксидантной и окислительной систем крови больных с различной этиологией и патогенезом до и после проведения сеансов АУФОК и ЭЛОК-терапии, сопоставление результатов биофизического и биохимического анализов изучаемых показателей с клинической картиной развития патологических состояний позволит осуществить математическое и физическое моделирование динамики развития заболеваний на различных стадиях его лечения, разработать рекомендации индивидуально-дифференцированного подхода к использованию АУФОК и ЭЛОК при лечении конкретных патологий и внедрить прикладные программы использования фотогемо- и лазеротерапии в медицине.

4.1.2. Радиационно-химические превращения структурных компонентов биомембран

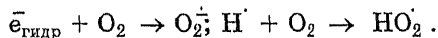
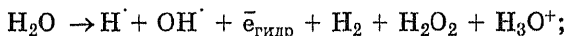
Процесс свободнорадикального пероксидного окисления липидов мембран рассматривают в настоящее время как один из механизмов “биохимического усиления” эффекта ионизирующей

радиации, который играет важную роль в развитии лучевого поражения живых систем.

При первичном взаимодействии (физическая стадия) ионизирующего излучения электромагнитной или корпускулярной природы с атомами вещества образуются положительно и отрицательно заряженные ионы, а также возбужденные электронные состояния атомов и молекул. В элементарном акте ионизации расходуется около 10—12 эВ энергии ионизирующей радиации (потенциал ионизации). Если передаваемая электрону энергия больше этой величины, то он сам становится источником ионизации других атомов; если меньше потенциала ионизации, имеет место возбуждение атома (молекулы). Физико-химическая стадия воздействия радиации на биообъекты существенно зависит от особенностей их структурно-функциональной организации. При этом большое значение имеет процесс радиоллиза воды:



Молекулярный кислород, растворенный в биологических жидкостях, вступая в реакцию с продуктами первичного радиоллиза, является источником образования супероксидного анион-радикала, гидропероксидов, органических пероксидов, эпоксидов:



Все последующие реакции, развивающиеся в живых системах под влиянием вышеуказанных продуктов взаимодействия ионизирующей радиации с веществом, носят свободнорадикальный характер (см. главу 3). Вклад косвенного действия (т. е. с участием воды) ионизирующего излучения на биологические молекулы составляет 85—90 %. АФК, образующиеся при лучевом воздействии, индуцируют окислительные реакции в макромолекулах по оксидазному или оксигеназному пути. В результате ферментативного или неферментативного оксигеназного окис-

ления образуются пероксидные продукты, способные к повреждению биомакромолекул и субклеточных структур.

Сравнительный анализ величин радиационно-химического выхода G (равного числу изменившихся или вновь образованных молекул на 100 эВ поглощенной энергии), используемого для характеристики радиочувствительности молекул, показал, что наиболее радиочувствительным компонентом клетки являются фосфолипиды ($G > 1$), выступающие в качестве источника образования первичных продуктов радиоллиза — органических радикалов и пероксидов, участвующих в реакциях инициации, продолжения и разветвления цепей свободнорадикального окисления.

Активные радикальные метаболиты ($O^{\cdot-}$, $OH^{\cdot}$, $HO_2^{\cdot}$, $H^{\cdot}$, $\bar{e}_{гидр}$) и продукты радиоллиза липидов мембран индуцируют в белках процессы окисления тиоловых и аминогрупп, образования внутри- и межмолекулярных сшивок, сопровождающиеся их инактивацией. В нуклеиновых кислотах и нуклеотидах происходят одно- и двутяжевые разрывы, модификация азотистых оснований, образование сшивок ДНК—ДНК и ДНК—белок.

Таким образом, в результате воздействия ионизирующей радиации на биомембраны происходит нарушение структурной организации всех ее компонентов, изменяется протекание транспортных и метаболических процессов, становится возможным выход лизосомальных ферментов (в частности, протеаз и нуклеаз), разрушение внутриклеточных структур и гибель клетки.

Важную роль в инактивации токсичных продуктов ПОЛ играют фосфолипазы, особенно фосфолипазы A_2 . В процессе фосфолипазного гидролиза происходит удаление из мембран наиболее глубоко деградированных фрагментов ненасыщенных жирных кислот липидов. В результате токсичные продукты ПОЛ переходят в гидрофильное окружение и подвергаются инактивации с участием монооксигеназной системы (в том числе цитохрома P-450) эндоплазматического ретикулума.

В 60-х гг. было показано, что ионизирующее излучение ингибирует работу натриевого насоса эритроцитов человека. Торможение активного оттока Na^+ наблюдается уже после облучения в дозах 8,9—89 Гр. При повышении дозы радиации до 200 Гр транспорт Na^+ и K^+ в эритроцитах полностью инактивируется. После облучения эритроцитов крысы в дозе 7 Гр также выявлено существенное торможение активности Na^+ , K^+ -АТФазы.

Результаты исследования влияния общего рентгеновского облучения на функциональные свойства Na^+ , K^+ -АТФазы мембран клеток печени крысы показали, что торможение удельной активности фермента отмечается в течение длительного времени (1 ч — 60 сут) после прекращения воздействия радиации. Через 1 ч потеря активности фермента составляла 87 %. Через 30 и 60 сут у выживших животных наблюдалась полная инактивация фермента.

Следовательно, ингибирование активного мембранного транспорта под действием ионизирующего излучения происходит в клетках различных типов, в разных условиях облучения в широком диапазоне доз. Предполагают, что сохранение жизнедеятельности клеток при дезактивации натриевого насоса связано с включением компенсаторных механизмов поддержания гомеостаза. Например, в мембранах эритроцитов при торможении активности Na^+ , K^+ -АТФазы активность Ca^{2+} -АТФазы превышает контрольный уровень, а в плазматических мембранах печени увеличивается Mg^{2+} -АТФазная активность. Известно, что Ca^{2+} и Mg^{2+} способствуют связыванию белков, в том числе АТФаз, с мембраной. В липидных бислоях Ca^{2+} обеспечивает образование мостиков между фосфатидами, в результате которого упаковка липидной фазы становится более плотной и уменьшается проницаемость мембраны. Кроме того, после рентгеновского облучения животных в дозе 5 Гр обнаруживается повышение активности щелочной фосфатазы, связанной с плазматическими мембранами клеток печени мышей. Щелочная фосфатаза — интегральный фермент плазматических мембран некоторых клеток — участвует в активном транспорте ионов Na^+ и K^+ .

Воздействие ионизирующего излучения приводит к существенному подавлению активности другого транспортного белка — HCO_3^- -АТФазы плазматических мембран клеток печени и эритроцитов, в результате которого возможно нарушение кислотно-щелочного равновесия в клетке и организме.

Торможение функциональной активности АТФаз, участвующих в активных транспортных процессах, коррелирует с нарушением баланса электролитов в облученной клетке, а также с изменением проницаемости плазматических и внутриклеточных мембран, вследствие чего регистрируется выход внутриклеточного калия, подавление окислительного фосфорилирования, утечка K^+ из митохондрий.

Функциональная активность мембраносвязанной 5'-нуклеотидазы печени крыс значительно возрастает при действии ионизирующей радиации как в ранние, так и в поздние сроки после облучения. Считают, что повышение активности этого фермента не связано с синтезом фермента *de novo*, а обусловлено перераспределением белка в растворе и в составе мембран.

По-видимому, механизмы пострадиационной вариабильности активности мембранных белков предусматривают реализацию регуляторных эффектов целого ряда факторов: например, влияния нейроэндокринной системы на функционирование ферментов в облученном организме, биологически активных веществ, продуктов перексидного окисления липидов, изменений зарядового состояния поверхностных участков мембраны и др.

Ионизирующее излучение индуцирует снижение общего уровня мембранных фосфолипидов и повышение содержания холестерина, что сопровождается возрастанием коэффициента холестерина/фосфолипиды до 1,05 при норме 0,60. Однако уровень индивидуальных фосфолипидов изменяется разнонаправленно: происходит накопление сфингомиелина и фосфатидилсерина и снижение содержания фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и особенно фосфатидилинозитола. В целом коэффициент насыщенности мембранных липидов повышется. Все это приводит к значительным нарушениям текучести мембраны, увеличению ее вязкости, изменению функциональных свойств мембранных белков. Предполагают, что механизм пострадиационной модификации состава и содержания структурных липидов в плазматических мембранах животной клетки связан с изменением процессов синтеза и распада липидпереносящих белков, ферментов липидного обмена, нарушением внутримембранной динамики липидных компонентов.

Вместе с тем необходимо отметить, что липиды клеточных мембран животных защищены от процесса ПОЛ при воздействии ионизирующей радиации по сравнению с искусственными мембранными структурами, в частности, липосомами. Накопление холестерина может препятствовать приросту уровня пероксидов липидов и приводить к торможению других процессов в мембране, связанных с развитием лучевой патологии. Кроме того, в мембранах локализованы собственные низкомолекулярные антиоксиданты (например, α -токоферол) и защитные антиокислительные ферментные системы. Так, результаты

модельных исследований свидетельствуют о том, что витамин Е образует комплексы с мембранными фосфолипидами, содержащими остатки арахидоновой кислоты. Формирование этих комплексов способствует стабилизации и снижению проницаемости клеточных мембран с высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот.

При изучении влияния минимальных летальных доз (154,8 мКл/кг) рентгеновского излучения на активность некоторых ферментов углеводного обмена клеток костного мозга крыс выявлено, что после облучения в популяциях миелокариоцитов активность лактат-, малат- и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназ значительно угнетается в течение 72 ч после облучения и достигает минимального значения на 3-и сутки эксперимента. На 10-е сутки наблюдается увеличение значений скорости реакций, катализируемых малат- и лактатдегидрогеназой, при снижении активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Следовательно, в ранние сроки после воздействия ионизирующей радиации на организм животных происходит усиление интенсивности анаэробных процессов и ослабление дыхания и пентозофосфатного пути.

Облучение животных ионизирующей радиацией вызывает не только изменения активности многих ферментов, регулирующих процессы клеточного метаболизма, но и относительного содержания изоферментов. Так, в ряде работ показано, что γ -облучение влияет на активность изоферментов лактатдегидрогеназы, кистой фосфатазы, неспецифической эстеразы. Причем при более низких дозах облучения величина изменений в относительном содержании изоформ может быть больше, чем при высоких. При анализе относительного содержания фракций изоферментов вышеуказанных белков в различные сроки после γ -облучения в дозе 1 Гр установлено, что воздействие радиации вызывает существенные изменения в относительном содержании изоформ изученных ферментов, которые имеют, по-видимому, фазовый характер. Считают, что эти результаты связаны с интенсивной перестройкой генетического аппарата клетки в период до 7 суток после облучения. Новому структурно-функциональному состоянию генетического аппарата соответствует иной уровень процессов метаболизма, происходит запуск адаптивных систем, нивелирующих нарушения, возникающие в результате воздействия ионизирующего излучения на организм.

А. И. Дворецким (1986) предложена гипотеза вероятной последовательности процессов нарушения энергетических и регуляторно-транспортных функций мембран в условиях воздействия ионизирующей радиации.

Иницилирующим процессом при действии лучевого фактора является активация пероксидного окисления липидов в клетке, происходящая на фоне резкого усиления эндогенного фосфолипазного гидролиза. В результате накопления продуктов ПОЛ происходит изменение баланса между эндогенными радиопротекторами и радиосенсибилизаторами в пользу последних.

Окисление мембранных липидов и повышенный эндогенный фосфолипазный гидролиз приводят к нарушению проницаемости биомембран для катионов. Это вызывает уменьшение уровня калия, увеличение содержания натрия и возрастание концентрации кальция в цитозоле, поэтому происходит насос-зависимое увеличение объема клетки, нарушение структурно-функционального состояния Na^+ , K^+ -АТФазы за счет конформационных изменений молекул фермента на фоне липид-белковых перестроек в мембране. В ответ на изменение ионного гомеостаза возможно компенсаторное увеличение количества молекул Na^+ , K^+ -АТФазы за счет "резервных". Однако вследствие деэнергизации клетки, индуцированной нарушением окислительного фосфорилирования и дефицита АТФ, функционирование Na^+ , K^+ -АТФазы оказывается затрудненным. Изменяется и активность Ca^{2+} -АТФазы. Все это, наряду с нарушением пассивной проницаемости, вызывает резкое увеличение уровня внутриклеточного кальция. В результате выявляются необратимые последствия, связанные с модификацией мембранного скелета и изменением формы клетки. Существенным моментом в патофизиологии клеточной гибели является вторичная активация фосфолипаз кальцием. Это приводит к фосфолипазному истощению мембран клеток и внутриклеточных органелл и возрастанию их проницаемости. Нарушения в функционировании всех клеточных систем способны индуцировать необратимые изменения в процессе жизнедеятельности клеток.

Необходимо отметить, что компоненты биологических мембран играют ключевую роль в развитии свободнорадикальных реакций в клетках и тканях, индуцируемых воздействием ионизирующего излучения, и патогенезе лучевого поражения живых организмов. Процессы нарушения липидного состава, текучести

липидных компонентов, подвижности липидных и белковых молекул, липид-белковых взаимодействий, изменения активности мембраносвязанных ферментов, собственных систем антирадикальной защиты представляют собой комплексный и взаимосвязанный механизм, индуцирующий пострадиационные структурно-функциональные перестройки биомембран и обеспечивающий переход клеток и организма на новый метаболический уровень функционирования.

4.2. УФ-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ И Na^+ , K^+ -АТФАЗЫ В ПРИСУТСТВИИ НЕКОТОРЫХ ХИМИЧЕСКИХ МОДИФИКАТОРОВ

4.2.1. Функциональная активность мембраносвязанной ацетилхолинэстеразы после УФ-облучения в присутствии бензилового спирта и конканавалина А

Значительный вклад в решение проблемы, касающейся изучения структурного состояния, локализации, особенностей функционирования отдельных компонентов в составе надмолекулярного комплекса, характера их взаимодействия с ближайшим молекулярным окружением, могут внести методические подходы, связанные с модификацией тех или иных структурных элементов мембран. В качестве модифицирующих агентов, применяемых как для исследования свойств интактных мембран, так и для регуляции метаболических процессов, осуществляющихся с их участием, активно используются разнообразные естественные и синтетические соединения, ферменты, физические факторы — УФ-излучение и температура.

Информативным тестом для оценки нативного состояния эритроцитарной мембраны, а также исследования структурных перестроек и изменений в функционировании ее основных компонентов — липидов и белков, индуцированных воздействием целого ряда физико-химических агентов, является определение функциональной активности конформационного маркера мембраны — ацетилхолинэстеразы (см. раздел 1.2.5).

На рис. 32 показаны изменения функциональной активности мембраносвязанной АХЭ после облучения мембран эритроцитов человека УФ-светом в интервалах длин волн 240—390 нм и 300—400 нм. Видно, что при воздействии УФ-излучения (240—390 нм)

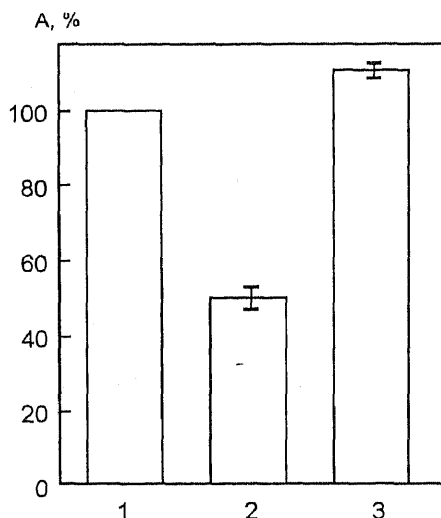


Рис. 32. Функциональная активность ацетилхолинэстеразы мембран эритроцитов человека, модифицированных воздействием УФ-излучения: 1 — контроль; 2 — УФ-облучение в интервале длин волн 300—400 нм; 3 — УФ-облучение в интервале длин волн 240—390 нм. Каталитическую активность регистрировали по методу Хестрина, основанному на колориметрическом определении концентрации ацетилхолина

на суспензию эритроцитарных мембран активность исследуемого фермента статистически достоверно возрастает на 12 %. Облучение мембран длинноволновым УФ-светом приводит к снижению функциональной активности АХЭ на 50 %. Таким образом, фоточувствительность мембранной АХЭ существенно зависит от спектрального состава УФ-света, а значит, она определяется ролью различных хромофоров мембран при их облучении в указанных диапазонах длин волн.

УФ-излучение в интервале длин волн 240—390 нм эффективно поглощается такими структурными компонентами эритроцитарной мембраны, как полиненасыщенные жирные кислоты фосфолипидов, а также ароматические и серосодержащие остатки интегральных белков. Необходимо отметить, что мембранные эффекты УФ-облучения в значительной степени вызываются пероксидным окислением липидов и лишь частично обусловлены фотохимическими превращениями белков. Следовательно, поглощение УФ-излучения в интервале длин волн 240—390 нм указанными выше хромофорами эритроцитарных мембран индуцирует такие структурные перестройки липидного бислоя и интегральных белков, которые, в свою очередь, затрагивают конформационное состояние АХЭ и приводят к увеличению ее функциональной активности.

И. Д. Волотовским и соавт. (1978), С. В. Коневым и И. Д. Волотовским (1979) при изучении влияния структурного состояния липидной фазы мембран эритроцитов на эффективность фо-

тохимической модификации АХЭ, связанной с мембраной, обработанной фосфолипазами, а также обедненной холестерином, сделано заключение о важной нефотохимической роли липидной фазы мембран в определении характера и эффективности действия УФ-света на активность фермента.

Учитывая эти данные, можно констатировать, что ПФОЛ, индуцированное УФ-излучением в интервале длин волн 240—390 нм, не приводит к фотодеструкции мембранной АХЭ, а посредством изменения контролирующих конформацию фермента белок-белковых и белок-липидных взаимодействий способствует более эффективному протеканию каталитической реакции. На наш взгляд, интересным представляется тот факт, что облучение мембран эритроцитов длинноволновым УФ-светом индуцирует резкое снижение каталитической активности АХЭ. Хромофорами УФ-света в данных условиях эксперимента являются различные (восстановленные) пиридиннуклеотиды, флавины, железопорфирины. Итак, ингибирование мембранного фермента в указанном случае может быть обусловлено фотохимическими превращениями вышеперечисленных хромофоров УФ-излучения. Не исключена вероятность локализации этих акцепторов УФ-света на мембране в непосредственной близости к исследуемому белку. Вместе с тем учитывая то обстоятельство, что хромофорные группы мембран (порфирины, флавины, нуклеотиды) выступают в качестве сенситизаторов ПФОЛ, можно предположить, что в процессы модификации АХЭ вносят вклад преимущественно фотохимические превращения указанных компонентов биомембран, а также фотосенсибилизированное ими пероксидное окисление липидов.

На рис. 33 представлены результаты исследования ферментативной активности мембранной АХЭ в присутствии конканавалина А из канавалии мечевидной (*Concanavalia ensiformis*) в концентрациях 0,4 и 0,8 моль/л. Конканавалин А относится к классу лектинов, связывание которых с поверхностью плазматической мембраны клеток имеет самые разнообразные последствия, например, вызывает изменение в расположении поверхностных белков и гликопротеинов, физическом состоянии липидов мембран, проницаемости их для различных веществ и активности мембранных ферментов (см. раздел 1.3). Конканавалин А, избирательно модифицируя структурно-функциональное состояние интегральных мембранных белков, способен изменять и фоточувствительность АХЭ.

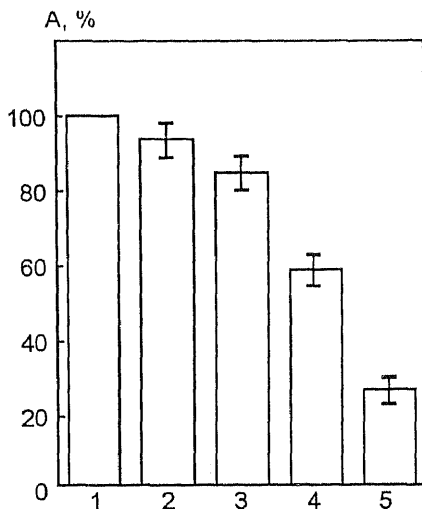


Рис. 33. Каталитическая активность ацетилхолинэстеразы мембран эритроцитов человека в присутствии конканавалина: 1 — контроль; 2 — конканавалин в концентрации 0,4 моль/л, соотношение суспензии мембран и конканавалина 1:0,05; 3 — конканавалин в концентрации 0,4 моль/л, соотношение 1:0,2; 4 — конканавалин в концентрации 0,4 моль/л, соотношение 1:1; 5 — конканавалин в концентрации 0,8 моль/л, соотношение 1:1

Из рис. 33 видно, что обработка мембран эритроцитов указанным модифицирующим агентом вызывает снижение функциональной активности фермента. При использовании объемных соотношений суспензии мембран и конканавалина 1:0,05 не зарегистрированы статистически достоверные различия величин активности мембранной АХЭ в нативном состоянии и в присутствии лектина. С увеличением этих соотношений до 1:0,2 и 1:1 активность фермента статистически достоверно снижается по сравнению с контролем на 16 и 42 % соответственно. Применение конканавалина в концентрации 0,8 моль/л и соотношении суспензии мембран и экзогенного модификатора 1:1 вызывает ингибирование мембранной АХЭ на 75 %.

Основные структурные особенности биологической мембраны и, следовательно, ее функциональная динамичность определяются свойствами липидного бислоя, существенно влияющего на подвижность белковых молекул и их ассоциацию в мембране.

Известно, что бензиловый спирт, взаимодействуя преимущественно с гидрофобными участками липидной фазы, увеличивает подвижность последней, а также изменяет подвижность ее отдельных компонентов.

На рис. 34 показаны изменения функциональной активности мембраносвязанной АХЭ в присутствии бензинового спирта. Инкубирование суспензии мембран с этим модификатором приво-

дит к снижению каталитической активности исследуемого фермента на 16—18 % по сравнению с контролем. Увеличение объема добавляемого спирта до 1 мл не вызывает усиления его ингибирующего действия по отношению к активности молекул АХЭ. Таким образом, увеличение подвижности липидной фазы с помощью бензилового спирта и, тем самым, модификация ближайшего окружения мембраносвязанной АХЭ — фосфатидилсерина индуцирует снижение ее ферментативной активности.

На рис. 35 представлены данные, полученные при исследовании функциональной активности АХЭ мембран эритроцитов, УФ-облученных в интервале длин волн 300—400 нм в присутствии конканавалина А. УФ-облучение интактных мембран эритроцитов индуцирует снижение каталитической активности АХЭ на 50 %, обусловленное, по всей вероятности, поглощением энергии УФ-света пиридиннуклеотидами, флавинами, железопорфиринами, витаминами, входящими в состав мембраны. При воздей-

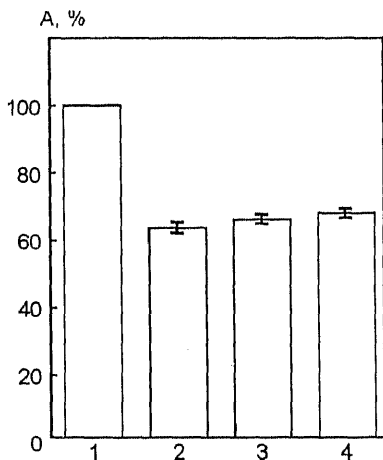


Рис. 34. Функциональная активность ацетилхолинэстеразы мембран эритроцитов человека, модифицированных 2 %-ным раствором бензилового спирта: 1 — контроль; 2 — соотношение суспензии мембран и бензилового спирта 1:0,05; 3 — соотношение этих компонентов 1:0,2; 4 — соотношение 1:1

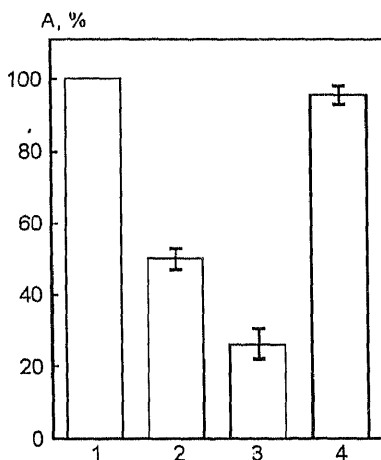


Рис. 35. Ферментативная активность ацетилхолинэстеразы мембран эритроцитов человека, облученных УФ-светом в области 300—400 нм в присутствии конканавалина А: 1 — контроль; 2 — активность УФ-облученной АХЭ; 3 — активность АХЭ в присутствии конканавалина; 4 — активность УФ-облученной АХЭ в присутствии конканавалина

ствии УФ-излучения на суспензию мембран эритроцитов в присутствии конканавалина А функциональная активность мембраносвязанной АХЭ возрастает на 45 % по отношению к исследуемому параметру при облучении нативных мембран. Конканавалин А характеризуется спектром поглощения с λ_{max} при 280 нм, что обусловлено светопоглощением остатков ароматических аминокислот, входящих в состав его молекулы. Следовательно, изменение фоточувствительности мембранной АХЭ в присутствии лектина может быть связано с влиянием на ее структурное состояние продуктов фотохимических превращений нуклеотидов, коферментов, железопорфиринов и витаминов, интенсивно поглощающих свет в данной области спектра.

На рис. 36 показаны изменения ферментативной активности АХЭ, модифицированной воздействием УФ-излучения (300—400 нм) в присутствии бензилового спирта. Из анализа рисунка следует, что облучение суспензии эритроцитарных мембран в присутствии указанного химического агента индуцирует резкое возрастание каталитической активности белка: 210 % по сравнению с ее уровнем при УФ-облучении интактных мембран (50 %).

Наблюдаемый эффект активации мембранной АХЭ может быть связан, по всей вероятности, со структурными перестройками молекул ближайшего липидного окружения фермента, обусловленными воздействием на него бензилового спирта и, прежде всего, его фотохимических продуктов. Вследствие разрыхления липидной фазы мембраны, модифицированной бензиловым спиртом, и увеличения подвижности ее отдельных компонентов возможно ослабление связей АХЭ с молекулами, находящимися в непосредственном контакте с ней, а именно фосфатидилсерина. Результатом этих процессов, по-видимому, являются конформационные превращения всей молекулы АХЭ и демаскирование ее активного центра на поверхности эритроцитарной мембраны, проявляющиеся в резком возрастании функциональной активности фермента.

При УФ-облучении мембран в диапазоне длин волн 240—390 нм в присутствии указанных экзогенных модификаторов наблюдаются противоположные по направлению изменения функционирования АХЭ.

На рис. 37 представлены результаты исследования каталитической активности мембраносвязанной АХЭ при воздействии УФ-излучения (240—390 нм) на суспензию мембран эритроцитов в присутствии конканавалина А (фитогемагглютинаина). Из

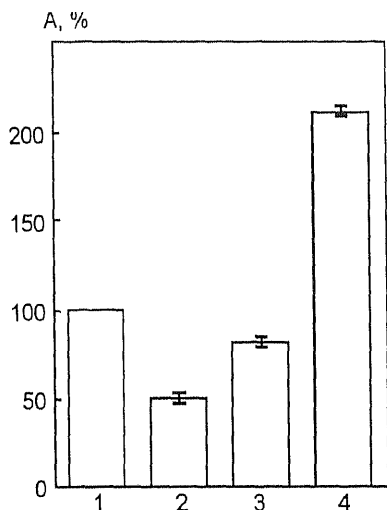


Рис. 36. Каталитическая активность ацетилхолинэстеразы мембран эритроцитов человека, облученных УФ-светом в области 300—400 нм в присутствии 2 %-ного бензилового спирта: 1 — контроль; 2 — активность УФ-облученной АХЭ; 3 — активность АХЭ в присутствии бензилового спирта; 4 — активность УФ-облученной АХЭ в присутствии бензилового спирта

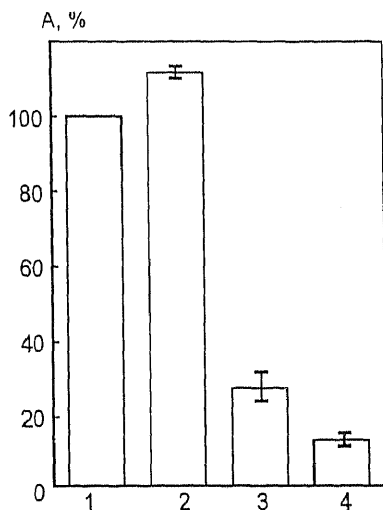


Рис. 37. Функциональная активность ацетилхолинэстеразы мембран эритроцитов человека, облученных УФ-светом в области 240—390 нм в присутствии конканавалина: 1 — контроль; 2 — активность УФ-облученной АХЭ; 3 — активность АХЭ в присутствии конканавалина; 4 — активность УФ-облученной АХЭ в присутствии конканавалина

анализа рисунка вытекает, что УФ-облучение мембран эритроцитов в его присутствии индуцирует значительное снижение активности этого фермента до 12 % (против 112 % при облучении интактных мембран). Вероятно, ингибирование мембраносвязанной АХЭ в данном случае происходит за счет конформационных изменений молекул фермента, обусловленных воздействием на последние, а также на молекулы интегральных белков продуктов фотолиза конканавалина и приводящих, по-видимому, к стерическому экранированию активного центра. Необходимо отметить, что УФ-облучение буферного раствора (рН 7,6) конканавалина А вызывает статистически достоверное снижение величины оптической плотности в максимуме поглощения при 280 нм, связанное либо с разрушением части хромофоров УФ-света лектина — ароматических аминокислотных остатков, либо с их экранирова-

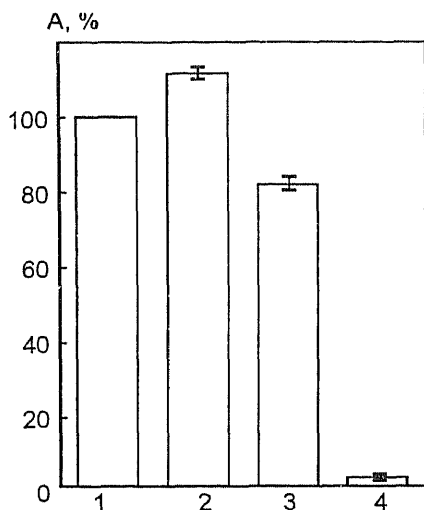


Рис. 38. Ферментативная активность ацетилхолинэстеразы мембран эритроцитов человека, облученных УФ-светом в области 240—390 нм в присутствии 2 %-ного бензилового спирта: 1 — контроль; 2 — активность УФ-облученной АХЭ; 3 — активность АХЭ в присутствии бензилового спирта; 4 — активность УФ-облученной АХЭ в присутствии бензилового спирта.

нием на поверхности белковой глобулы. Однако не исключена вероятность и прямого воздействия УФ-излучения на АХЭ.

При УФ-облучении (240—390 нм) эритроцитарных мембран в присутствии бензилового спирта обнаруживается практически полное ингибирование мембранной АХЭ (рис. 38). По-видимому, наблюдаемый эффект может быть обусловлен реализацией нескольких параллельно протекающих процессов, индуцированных воздействием УФ-излучения на эритроцитарные мембраны и приводящих к экранированию активного центра:

1) возможная интенсификация ПФОЛ вследствие увеличения подвижности липидной фазы мембран под влиянием бензилового спирта, образование продуктов ПФОЛ, влияющих на конформацию АХЭ и ее активного центра непосредственно или опосредованно через взаимодействие с интегральными белками;

2) фотопревращения интегральных белков мембраны, поглощающих свет в данной области спектра, в том числе и самого фермента (однако в незначительной степени);

3) поглощение квантов УФ-излучения с длинами волн 330—370 нм пиридиннуклеотидами, флавинами, коферментами, железопорфиринами; фотосенсибилизация ими процессов ПФОЛ; непосредственное влияние их фотохимических продуктов на структурное состояние АХЭ и ее активного центра.

Таким образом, путем модификации отдельных структурных компонентов эритроцитарных мембран различными химически-

ми агентами и выбора условий их УФ-облучения в зависимости от природы и содержания хромофорных групп можно существенно изменять фоточувствительность мембранных белков, в том числе АХЭ.

4.2.2. Фоточувствительность ацетилхолинэстеразы эритроцитарных мембран в присутствии фосфолипазы D и аскорбиновой кислоты

К группе естественных модификаторов, изменяющих липидный состав мембран в нативной клетке, относятся липидпереносящие белки, ферменты обмена фосфолипидов — фосфолипазы, диметилазы и др., а также системы обмена холестерина. Вследствие их деятельности осуществляются выраженное изменение содержания лизоформ отдельных липидов, накопление в бислое жирных кислот, обладающих детергентным действием, изменение соотношения фосфатидилхолин/фосфатидилэтанолламин и фосфолипиды/холестерин. Все эти факторы управляют микровязкостью мембраны и оказывают влияние на подвижность ее компонентов.

Фосфолипазы — обширный класс липолитических ферментов, имеющих первостепенное значение для регулирования разнообразных процессов жизнедеятельности всех живых организмов. Это связано с многообразием их функций. Во-первых, они участвуют в обновлении мембранных фосфолипидов, что определяет стабильность и биохимическую активность мембран и в конечном итоге функциональное состояние целой клетки. Во-вторых, продукты фосфолипазной реакции (жирные кислоты, лизофосфатидилхолин, холин, диглицерид, фосфорилхолин и др.) являются мощными эффекторами мембранных процессов. В-третьих, фосфолипазам принадлежит ключевая роль в биосинтезе простагландинов, лейкотриенов и других продуктов превращения арахидоновой кислоты. Так, реакцию гидролиза фосфолипидов, приводящую к образованию свободной арахидоновой кислоты, катализирует фосфолипаза A_2 . Эта реакция является лимитирующей стадией в “каскаде” ферментативных реакций биосинтеза физиологически активных эйкозаноидов.

Вместе с тем всестороннее изучение структурно-функциональных свойств фосфолипаз имеет важное не только теоретическое, но и практическое значение для медицины и фармакологии. Многие патологические процессы, в том числе ишемия и воспаление,

сопровождаются увеличением активности внутриклеточных фосфолипаз. Предполагают, что продукты метаболизма арахидоновой кислоты участвуют в защитной реакции организма при облучении, а также комбинированном радиационно-термическом поражении его отдельных систем.

Фосфолипазы (фосфатацилгидролазы, КФ 3.1) — ферменты, катализирующие гидролитическое расщепление сложноэфирных связей в различных фосфолипидах. Фосфолипазы A_1 , A_2 , В, С, D различают в зависимости от того, какая из четырех эфирных связей, имеющихся в молекулах фосфатидов, гидролизуется ферментом. Существует также цифровая номенклатура фосфолипаз соответственно положению расщепляемой сложноэфирной связи: 1, 2, 3, 4 (рис. 39).

Фосфолипазы различного происхождения способны также катализировать реакции ферментативного трансалкилирования (фосфолипаза D) и трансацилирования (другие фосфолипазы).

Липолитические ферменты гидролизуют водонерастворимые субстраты, следовательно, они должны функционировать на границе раздела фаз. Обычно их молекулы состоят из трех участков: гидрофобного, который создает необходимую ориентацию фермента на поверхности субстрата, и активного центра, находя-

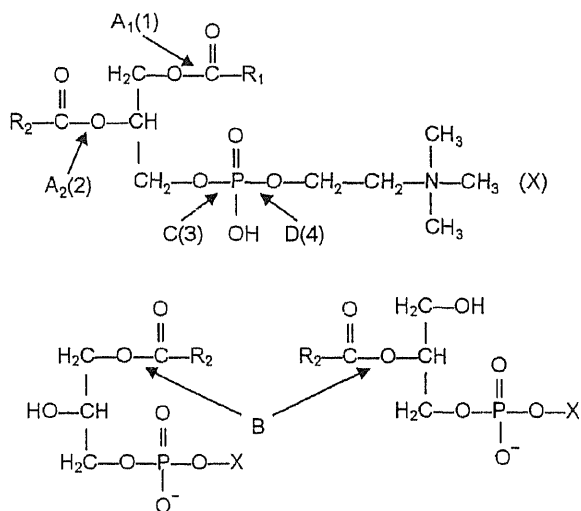
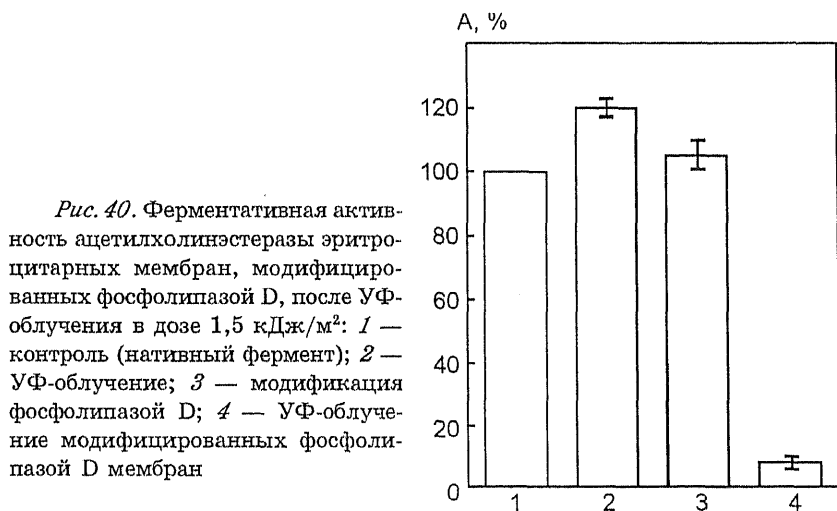


Рис. 39. Схема действия и номенклатура фосфолипаз

щегося вблизи головки, но не идентичного ей, и гидрофильного хвоста, стабилизирующего ориентацию белковых молекул.

По аналогии с другими гидролитическими ферментами для фосфолипаз предполагают наличие различных типов активных центров: серингистидинового, карбоксил-карбоксилатного, Zn^{2+} -карбоксилатного, цистеин-гистидинового. Именно с участием этих групп происходит осуществление каталитического акта гидролитическими ферментами.

Фосфолипаза D (фосфатидилхолин-фосфатидатгидролаза, фосфолипаза 4) гидролизует эфирную связь между фосфатной группой и гидрофильным спиртом в фосфоглицеридах и соответствующую связь в сфингомиелинах. Фермент был впервые обнаружен в корнеплоде моркови и листьях шпината, он содержится также и в других растениях: свекле, брюссельской и савойской капусте. Субстратами фосфолипазы D являются фосфолипиды и их лизопроизводные. Легкость гидролиза уменьшается в последовательности: фосфатидилглицерин, лизофосфатидилхолин, дифосфатидилглицерин. Ферментативные процессы с участием растворимых фосфолипаз и нерастворимых субстратов протекают на границе раздела фаз: липид — вода. Эти процессы предполагают первоначально реакцию иммобилизации водорастворимого фермента на поверхности субстрата. Поэтому фосфолипаза D может использоваться в качестве модели для исследования гетерогенного ферментативного катализа и изучения примембранных ферментов.



На рис. 40 показаны УФ-индуцированные изменения функциональной активности АХЭ мембран эритроцитов, модифицированных фосфолипазой D, в интактном состоянии и после УФ-облучения в дозе 1,5 кДж/м². Предварительная обработка эритроцитарных мембран раствором фосфолипазы D в концентрации 10⁻⁶ моль/л (рН 5,6; 0,03 моль/л CaCl₂) с последующим удалением модифицирующего агента путем центрифугирования практически не влияет на величину каталитической активности мембранной АХЭ: уровень изучаемого параметра — 105 % по отношению к таковому для нативных мембран (100 %). Однако УФ-облучение эритроцитарных мембран, обработанных фосфолипазой D, индуцирует резкое снижение функциональной активности АХЭ до 8 %. Следовательно, воздействие УФ-света на мембраносвязанный фермент после модификации липидной фазы мембран вызывает его инактивацию, т. е. выявляется эффект, противоположный наблюдаемым изменениям (активация) исследуемого параметра при облучении интактных мембран. Таким образом, в случае химической модификации липидного компонента мембраны путем гидролиза фосфоглицеридов и сфингомиелина как на внешней, так и на внутренней поверхности мембраны фоточувствительность эритроцитарной АХЭ существенно изменяется.

Аналогичные результаты были получены и при исследовании функциональной активности АХЭ мембран эритроцитов, модифицированных фосфолипазой, в нативном состоянии и после УФ-облучения в дозе 3,0 кДж/м² (рис. 41). Воздействие УФ-излучения в дозе 3,0 кДж/м² на эритроцитарные мембраны, обработанные фосфолипазой D, приводит к практически полному ингибированию фермента. Следовательно, и в этом случае модификация липидной фазы мембран вызывает инактивацию АХЭ — эффект, противоположный изменениям активности белка, регистрируемым при облучении интактных мембран.

На рис. 42 показаны изменения ферментативной активности мембраносвязанной АХЭ после обработки мембран фосфолипазой D и воздействия УФ-света в дозе 4,5 кДж/м². Видно, что в результате УФ-облучения модифицированных мембран фоточувствительность фермента изменяется незначительно. Активность АХЭ в интактных мембранах после облучения снижается на 44 %, а в обработанных фосфолипазой — на 52 % по отношению к контрольному образцу.

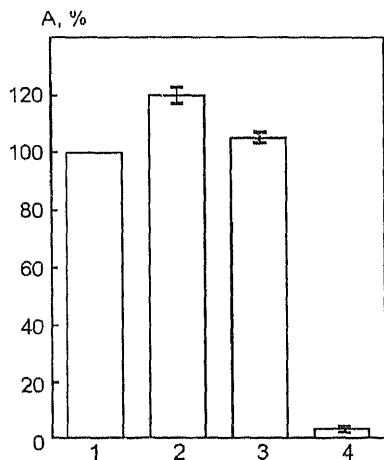


Рис. 41. Каталитическая активность ацетилхолинэстеразы эритроцитарных мембран, модифицированных фосфолипазой D, после УФ-облучения в дозе 3,0 кДж/м²: 1 — контроль (нативный фермент); 2 — УФ-облучение; 3 — модификация фосфолипазой D; 4 — УФ-облучение модифицированных фосфолипазой D мембран

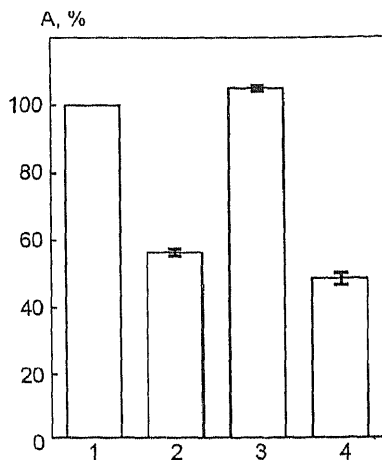


Рис. 42. Функциональная активность ацетилхолинэстеразы эритроцитарных мембран, модифицированных фосфолипазой D, после УФ-облучения в дозе 4,5 кДж/м²: 1 — контроль (нативный фермент); 2 — УФ-облучение; 3 — модификация фосфолипазой D; 4 — УФ-облучение модифицированных фосфолипазой D мембран

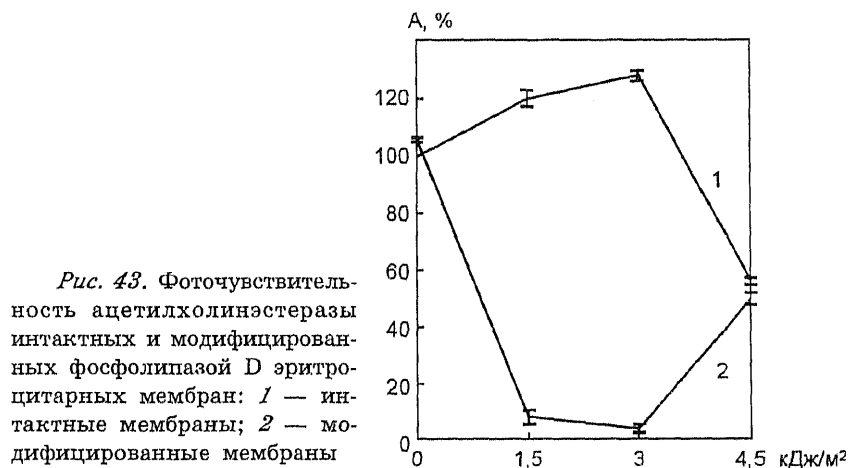


Рис. 43. Фоточувствительность ацетилхолинэстеразы intactных и модифицированных фосфолипазой D эритроцитарных мембран: 1 — intactные мембраны; 2 — модифицированные мембраны

На рис. 43 представлены данные, характеризующие зависимость функциональных свойств мембранной АХЭ от дозы облучения для интактных и обработанных фосфолипазой D эритроцитарных мембран. Полученные результаты свидетельствуют о том, что УФ-чувствительность мембраносвязанной ацетилхолинэстеразы существенным образом зависит от структурного состояния фосфолипидных компонентов биомембраны.

Фосфолипаза D катализирует отщепление гидрофильного спирта от фосфоглицеридов и сфингомиелинов. В результате отщепления полярных головок от молекул фосфолипидов могут нарушаться электростатические взаимодействия фермента с молекулами окружающих его фосфолипидов, в частности, кислого липида — фосфатидилсерина, являющегося, по-видимому, аннулярным липидом для ацетилхолинэстеразы. Фосфатидилсерин, а также фосфатидилэтаноламин локализованы преимущественно во внутренней половине липидного бислоя. Можно предположить, что гидролиз фосфолипидов и фосфатидилсерина не вызывает конформационных изменений молекул фермента, затрагивающих его активный центр, поэтому активность АХЭ при обработке мембран фосфолипазой практически не изменяется. Необходимо отметить, что обработка мембран фосфолипазой индуцирует изменения упаковки и подвижности фосфолипидов, вязкости и асимметрии липидной фазы, белок-липидных взаимодействий. Воздействие УФ-излучения на модифицированные мембраны приводит к нарушениям в функционировании мембраносвязанной АХЭ, отличающимся по направленности от таковых при облучении интактных мембран. Эти нарушения являются результатом изменения конформационного состояния продуктов гидролиза фосфолипидов в мембране при воздействии УФ-света.

Е. А. Лапшина, И. Б. Заводник (1995) установили, что взаимодействие свободных жирных кислот (пальмитиновой, лауриновой, каприловой) и их производных с эритроцитарной мембраной вызывает ингибирование АХЭ цельных эритроцитов и изолированных эритроцитарных мембран. Авторы считают, что воздействие жирных кислот и их производных на мембрану приводит к изменению белок-липидных контактов, возмущению нативного липидного окружения фермента, нарушению максимальной комплементарности между гидрофобной поверхностью мембранных белков и их липидным окружением. Обработка эритро-

цитов малоновым диальдегидом, способным модифицировать аминок- и сульфгидрильные группы белков, образуя ряд стабильных и нестабильных аддуктов, внутри- и межбелковые сшивки, приводила к ингибированию активности АХЭ по бесконкурентному механизму.

Таким образом, выявляется различная УФ-чувствительность АХЭ интактных и модифицированных фосфолипазой D эритроцитарных мембран, обусловленная нарушением нативной конформации фермента вследствие воздействия на него фотохимических продуктов гидролиза фосфолипидов.

Большой интерес в настоящее время представляют вопросы, касающиеся всестороннего изучения процессов фотомодификации отдельных компонентов биомембран в присутствии химических соединений с различным механизмом действия, способных инициировать, усиливать или ослаблять фотохимические реакции. Одним из факторов системы низкомолекулярных регуляторов, выполняющих роль инициаторов, катализаторов, ингибиторов и влияющих на стадию инициирования, разветвления и обрыва цепи свободнорадикальных реакций, являются низкомолекулярные компоненты антиоксидантной системы (см. раздел 3.3).

Содержание аскорбиновой кислоты, обладающей чрезвычайно широким спектром антиоксидантных свойств, составляет в плазме крови 50—200 мкмоль/л. Вместе с тем известно, что низкомолекулярные антиоксиданты способны проявлять свои защитные

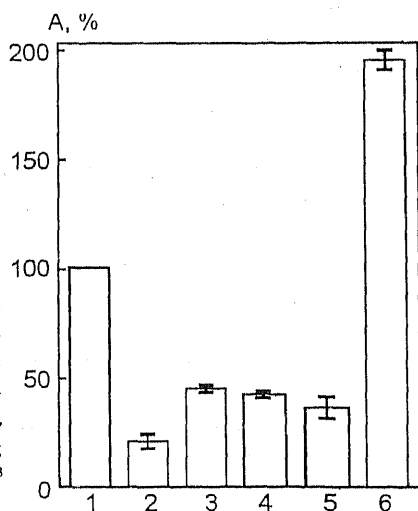


Рис. 44. Ферментативная активность ацетилхолинэстеразы эритроцитарных мембран в присутствии аскорбиновой кислоты в различных концентрациях (моль/л): 1 — контроль (нативные мембраны); 2 — $0,5 \cdot 10^{-3}$; 3 — 10^{-4} ; 4 — 10^{-5} ; 5 — 10^{-6} ; 6 — 10^{-8}

функции в широком интервале концентраций: от 10^{-2} до 10^{-18} моль/л. На рис. 44 показаны изменения функциональной активности АХЭ эритроцитарных мембран в присутствии аскорбата в различных концентрациях. Из анализа данных, представленных на этом рисунке, следует, что добавление к суспензии эритроцитарных мембран аскорбиновой кислоты в концентрациях $0,5 \cdot 10^{-3}$, 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} моль/л индуцирует статистически достоверное снижение уровня каталитической активности АХЭ. Использование экзогенного агента в минимальной концентрации (10^{-8} моль/л) приводит к активации фермента на 93 % по отношению к контрольному образцу (100 %).

Витамины А, С, D и F, при окислении и аутоокислении которых образуются промежуточные радикальные формы (например, пероксид водорода), могут выполнять роль инициаторов окисления и ускорять ПОЛ, увеличивая скорость зарождения цепей в мембранах. Кроме того, в присутствии ионов железа и меди, содержащихся в эритроцитарной мембране, аскорбиновая кислота становится мощным прооксидантом, что указывает на необходимость *in vivo* надежной секвестрации свободных ионов металлов переменной валентности. Проявление аскорбатом анти- и прооксидантных свойств зависит также от концентрации субстрата и условий протекания окислительных реакций.

Следовательно, в интервале используемых концентраций $0,5 \cdot 10^{-3}$ — 10^{-6} моль/л аскорбиновая кислота проявляет прооксидантные свойства, что находит отражение в снижении функциональной активности мембраносвязанной ацетилхолинэстеразы. Промежуточные радикальные формы, образующиеся при окислении аскорбата, усиливают и ускоряют ПОЛ, в результате которого накапливаются пероксидные продукты. Ацетилхолинэстераза принадлежит к числу ферментов мембран, легко инактивируемых при пероксидном окислении ненасыщенных жирных кислот. Наиболее важные изменения в белковых молекулах, вызываемые окисленными липидами, заключаются в образовании комплекса окисленный липид — белок, ассоциации белковых молекул и разрушении аминокислот, в частности, содержащих SH-группы.

На рис. 45 представлены данные, полученные при исследовании уровня функциональной активности АХЭ эритроцитарных мембран, УФ-облученных в дозе $4,5 \text{ кДж/м}^2$ в присутствии аскорбиновой кислоты. УФ-облучение интактных мембран вызывает снижение активности фермента на 44 %. Совместное дей-

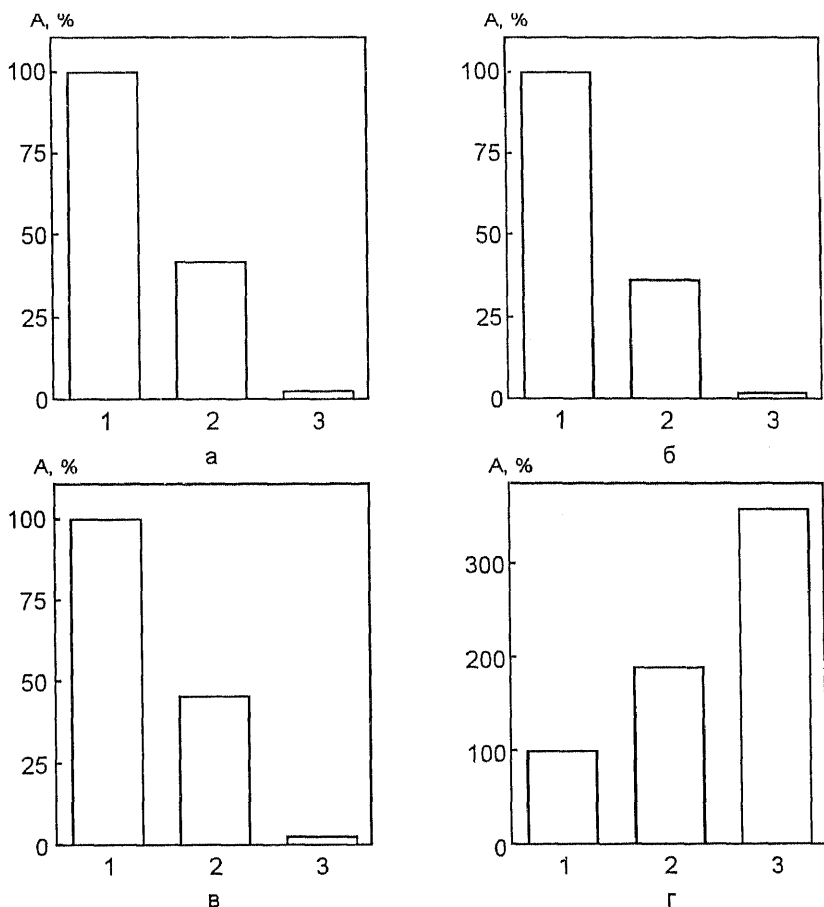
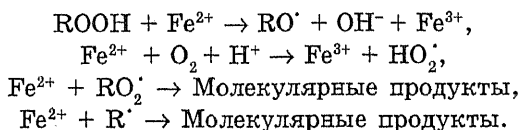


Рис. 45. Изменения каталитической активности мембраносвязанной ацетилхолинэстеразы, УФ-облученной в присутствии аскорбата: 1 — контроль (нативные мембраны); 2 — в присутствии аскорбата; 3 — УФ-облучение в присутствии аскорбата. Концентрация аскорбата, моль/л: а — 10^{-4} ; б — 10^{-5} ; в — 10^{-6} ; г — 10^{-8}

ствие УФ-излучения и аскорбата в концентрациях 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} моль/л индуцирует полное ингибирование мембранной АХЭ. УФ-облучение мембран эритроцитов в комплексе с модифицирующим агентом (10^{-8} моль/л) приводит к резкому повышению функциональной активности белковой молекулы.

При изучении ПОЛ в мембранах митохондрий и микросом было установлено, что существенное усиление накопления перок-

сидных продуктов может быть вызвано добавлением солей двухвалентного железа, аскорбиновой кислоты и соединений, содержащих сульфгидрильные группы, например, цистеина или глутатиона. В 1959 г. Оттоленги обнаружил, что накопление пероксидов связано с наличием в изучаемой среде двухвалентного железа. Он предположил, что ионы Fe^{2+} оказывают каталитическое действие на образование пероксидов. При этом Fe^{2+} окисляется до Fe^{3+} , а функция аскорбиновой кислоты заключается в регенерации ионов за счет обратного восстановления Fe^{3+} до Fe^{2+} . Ведущую роль ионов Fe^{2+} в процессе ПОЛ в биомембранах определяет совокупность следующих реакций:



Следует подчеркнуть, что скорость ПОЛ определяется соотношением концентраций ионов Fe^{2+} , гидропероксидов, свободных радикалов $\text{RO}_2\cdot$. Ионы железа играют одновременно функцию про- и антиоксидантов. Их антиокислительное действие проявляется только при достаточно высоких концентрациях Fe^{2+} ($>10^{-5}$ — 10^{-4} моль/л).

По всей вероятности, ингибирование мембраносвязанной АХЭ при ее УФ-облучении в присутствии аскорбата (10^{-4} — 10^{-6} моль/л) представляет собой результат параллельного протекания пероксидного фотоокисления ненасыщенных жирных кислот фосфолипидов и аскорбатзависимого ПОЛ с участием ионов Fe^{2+} . Причем эти процессы взаимоусиливают друг друга. Антиоксидантный и активирующий эффекты аскорбата по отношению к уровню функциональной активности мембраносвязанной АХЭ зарегистрированы только в присутствии экзогенного агента в концентрации 10^{-8} моль/л. В данном случае реализуются процессы обезвреживания аскорбиновой кислотой активных форм кислорода (супероксидного анион-радикала, синглетного кислорода, гидропероксидного радикала, гидроксильного радикала, пероксидных радикалов липидов), восстановления α -токоферильного радикала.

Изучение фоточувствительности мембраносвязанной АХЭ в присутствии химических агентов, модифицирующих липидную фазу мембраны, позволяет расширить современные представления о молекулярных механизмах регулирования активности важнейших компонентов биомембран. На основании собственных эк-

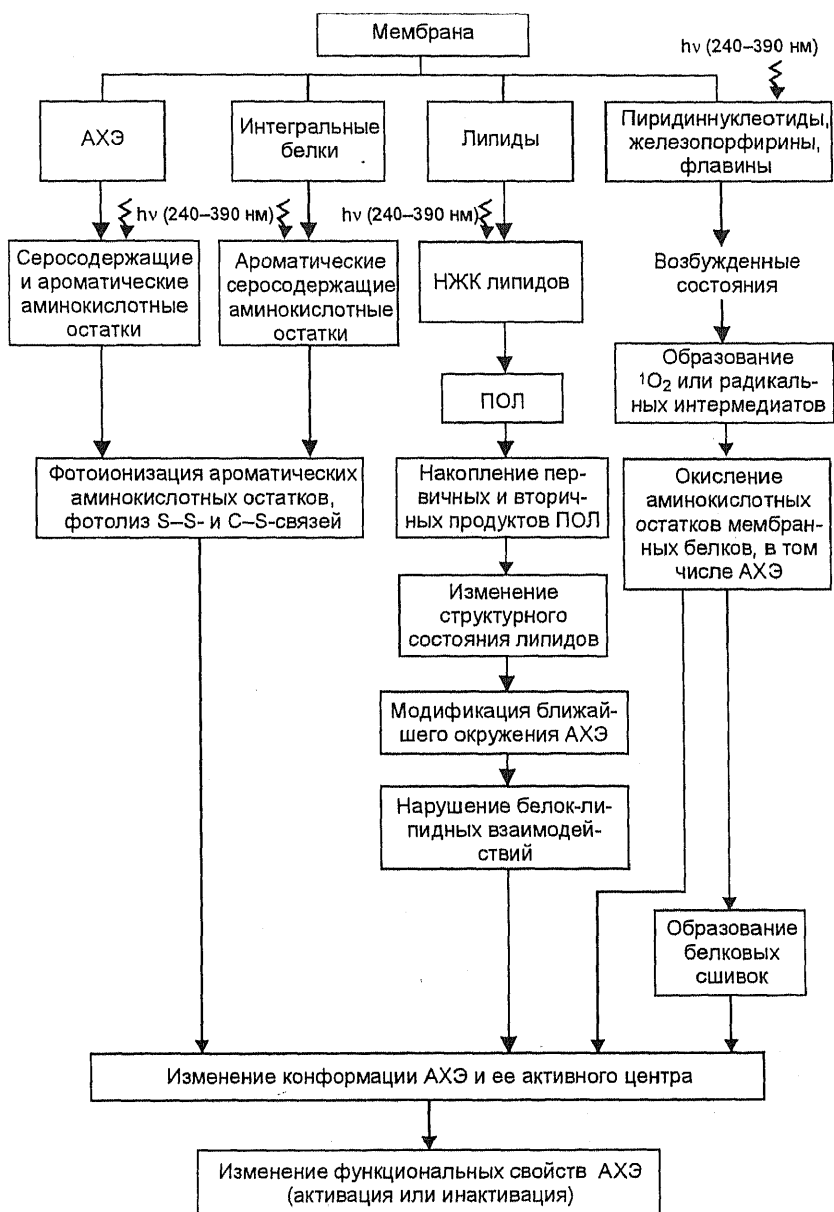


Рис. 46. Схема процессов, приводящих к фотомодификации мембранной ацетилхолинэстеразы

спериментальных и литературных данных предложена схема процессов, приводящих к фотомодификации мембранной АХЭ, учитывающая вклад УФ-превращений самого фермента, а также отдельных структурных компонентов мембран (рис. 46). Кроме того,

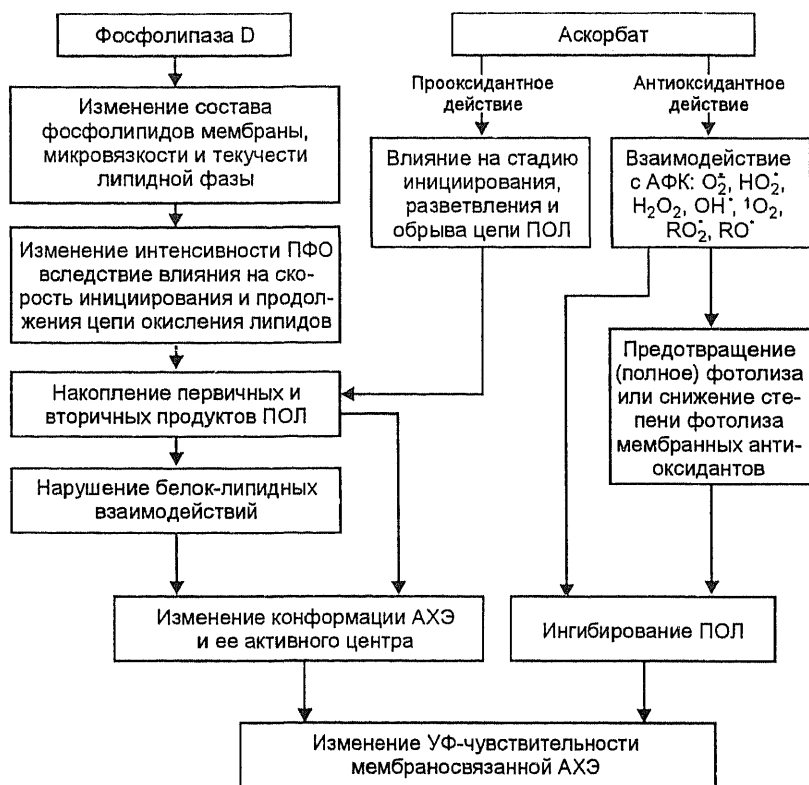


Рис. 47. Модуляция фоточувствительности мембраносвязанной ацетилхолинэстеразы

разработана схема модуляции фоточувствительности ацетилхолинэстеразы путем модификации структурного состояния липидной фазы эритроцитарной мембраны в присутствии фосфолипазы D и аскорбиновой кислоты (рис. 47).

Выявлены важная роль микроокружения в процессах функционирования АХЭ и возможность целенаправленного регулирования степени ее УФ-чувствительности путем введения в изучаемую систему экзогенных агентов, модифицирующих конфор-

мацию ближайших “соседей” фермента в биомембране. Исследования подобного рода полезны при обсуждении вопросов, касающихся выяснения механизмов влияния УФ-излучения на структурно-функциональное состояние эритроцитарных мембран в норме и в присутствии ряда химических соединений. Они расширяют современные представления об особенностях фотохимических превращений белков-ферментов в составе мембран клеток и могут быть использованы для разработки новых физико-химических подходов к мембранному скринингу разнообразных по своей природе и механизмам действия химических соединений, а также к выявлению структурных нарушений компонентов мембран, обусловленных действием указанных внешних факторов.

4.2.3. УФ-индуцированные изменения функциональных свойств мембраносвязанной Na^+ , K^+ -АТФазы в присутствии фосфолипазы D

На рис. 48 представлены данные по исследованию фоточувствительности мембраносвязанной Na^+ , K^+ -АТФазы при воздействии УФ-излучения (240—390 нм) в дозах 1,5 и 3,0 кДж/м² на интактные мембраны эритроцитов человека. Из анализа рисунка следует, что при облучении мембран происходит статистически достоверное снижение уровня каталитической активности исследуемого фермента.

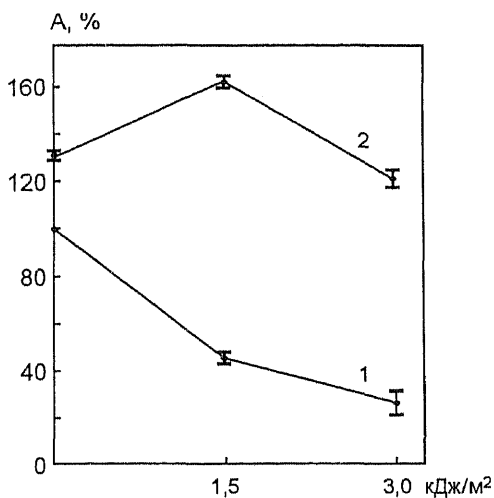


Рис. 48. УФ-индуцированные изменения функциональной активности Na^+ , K^+ -АТФазы эритроцитарных мембран, модифицированных фосфолипазой D: 1 — УФ-облучение интактных мембран; 2 — УФ-облучение модифицированных фосфолипазой мембран

В состав активного центра Na^+ , K^+ -АТФазы входят высоко-реакционноспособные остатки тирозина и цистина, поглощение УФ-света которыми обуславливает процесс фотомодификации фермента.

Воздействие длинноволнового УФ-света в интервале длин волн 320—390 нм ($\lambda_{\text{max}} = 365$ нм) в течение 30 мин приводит к полному ингибированию ферментативной активности Na^+ , K^+ -АТФазы. Хромофорами УФ-света в этом диапазоне длин волн являются различные (восстановленные) пиридиннуклеотиды, флавины, железопорфирины. Таким образом, инактивация мембраносвязанного фермента в данном случае может быть обусловлена фотохимическими превращениями вышеуказанных хромофоров. Не исключена вероятность локализации этих акцепторов УФ-излучения на мембране в непосредственной близости к исследуемому белку. Вместе с тем, учитывая то обстоятельство, что хромофорные группы мембран (порфирины, флавины, нуклеотиды) выступают в качестве сенситизаторов пероксидного окисления липидов, можно предположить, что в процесс модификации Na^+ , K^+ -АТФазы вносят вклад преимущественно вышеуказанные компоненты эритроцитарных мембран, а также фотосенсибилизированное ими пероксидное окисление липидов. При УФ-облучении выделенных микросом мозга крыс обнаруживается корреляция между снижением активности Na^+ , K^+ -АТФазы и пероксидным окислением липидов, оцениваемым по содержанию полиненасыщенных жирных кислот и накоплению малонового диальдегида (J. Jamme et al., 1995). Подавление активности Na^+ , K^+ -АТФазы при облучении микросом УФ-светом снижалось тушителем свободных радикалов — тиомочевинной и не изменялось в присутствии “защитника” тиолов — дитиотреитола. Авторы считают, что эффект ПОЛ опосредуется нарушением целостности мембран, а не структурными изменениями самого фермента.

В 1967 г. Liberman показал, что УФ-излучение (255—285 нм) ингибирует Na^+ , K^+ -АТФазную активность нервных волокон краба. Видимый свет ингибировал Na^+ , K^+ -АТФазу различных типов клеток, сенситизируемых метиленовым синим, бенгальским розовым или протопорфирином, благодаря фотодинамическому эффекту. Однако чувствительность Na^+ , K^+ -АТФазы к видимому свету в отсутствие экзогенных фотосенсибилизаторов не показана. Воздействие излучения аргонового лазера (488 нм, 0,1 Вт/см²) индуцировало ингибирование Na^+ , K^+ -АТФазы из мозга крыс дозозависимым образом.

В состав α - (более гидрофобна) и β -субъединиц молекул этого белка входят некоторые фосфолипиды, среди которых преобладают фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин, сфингомиелин. Вероятно, модификация липидного бислоя при облучении мембран затрагивает конформационное состояние не только пограничных (аннулярных) липидов АТФазы, но и непосредственно фосфолипидных компонентов ее α -субъединицы, что приводит к изменению структуры активного центра фермента и нарушению его функциональных свойств.

При изучении УФ-индуцированных изменений ферментативной активности Na^+ , K^+ -АТФазы эритроцитарных мембран, модифицированных фосфолипазой D, было установлено, что предварительная обработка мембран фосфолипазой (10^{-6} моль/л, pH 5,6; 0,3 моль/л CaCl_2) приводит к увеличению уровня этого параметра на 33 % по сравнению с контрольным образцом (100 %). Фосфолипаза D, как уже отмечалось, катализирует отщепление гидрофильного спирта от фосфоглицеридов и сфингомиелинов. В результате отщепления полярных головок от молекул фосфолипидов могут нарушаться электростатические взаимодействия мембраносвязанных ферментов с молекулами окружающих их фосфолипидов. A. Johannsson et al. (1981) показали, что увеличение или уменьшение толщины липидного бислоя может влиять на активность Na^+ , K^+ -АТФазы за счет перемещения полярных головок фосфолипидов, обращенных к ферментному белку. По-видимому, гидролиз фосфолипидов мембраны, в том числе и аннулярных для Na^+ , K^+ -АТФазы, вызывает конформационные изменения молекул фермента, затрагивающие его активный центр, что находит отражение в увеличении уровня активности исследуемого белка.

На рис. 48 показаны УФ-индуцированные изменения функциональной активности Na^+ , K^+ -АТФазы эритроцитарных мембран, обработанных фосфолипазой D. После модификации фосфолипидов мембраны фоточувствительность связанного фермента существенно изменяется. Воздействие УФ-света на обработанные фосфолипазой мембраны приводит к нарушениям в функционировании Na^+ , K^+ -АТФазы, отличающимся по направленности от таковых при облучении интактных мембран, т. е. происходит фотоактивация модифицированного фермента. Следовательно, обработка липидной фазы фосфолипазой нивелирует протекание процессов, обуславливающих фотоинактивацию Na^+ ,

K⁺-АТФазы в УФ-облученных интактных мембранах, и повышает фотостабильность фермента.

Изменения в функционировании мембраносвязанной Na⁺, K⁺-АТФазы в УФ-облученных мембранах, предварительно модифицированных фосфолипазой D, являются, по-видимому, результатом изменения конформационного состояния аннулярных липидов, нарушения белок-липидных взаимодействий, ответственных за проявление каталитической активности фермента.

Обобщая результаты вышеописанных исследований по изучению УФ-индуцированных изменений функциональной активности Na⁺, K⁺-АТФазы и АХЭ эритроцитарных мембран, обработанных фосфолипазой D, можно заключить, что в присутствии последней проявляется различная фоточувствительность этих ферментов, обусловленная нарушениями их нативной конформации вследствие модификации белок-липидных взаимодействий, а также влияния фотохимических продуктов молекул мембранных фосфолипидов.

Такие различия в “ответной реакции” двух мембранных белков на воздействие физико-химических факторов (УФ-излучение, действие фосфолипаз) связаны с различиями в их локализации на мембране, в расположении их активных центров, в характере взаимодействия с “ближайшими” липидными молекулами и их химическим строением. Однако экспериментальные данные, касающиеся возможности модуляции фоточувствительности мембранных ферментов, — Na⁺, K⁺-АТФазы и ацетилхолинэстеразы, возможно, взаиморегулируемых субстратами их реакций, свидетельствуют в пользу представлений об общности основных регуляторных механизмов функционирования для многих векторных ферментов биомембран.

4.3. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В КОМПЛЕКСЕ С ЭРИТРОЦИТАРНЫМИ МЕМБРАНАМИ И ИХ КОМПОНЕНТАМИ В ИНТАКТНОМ СОСТОЯНИИ И ПОСЛЕ УФ-ОБЛУЧЕНИЯ

В настоящее время считается общепризнанным, что “классическое” исследование ферментов *in vitro* без учета их взаимодействия с различными субклеточными структурами не может дать адекватного представления о закономерностях и механизмах их функционирования в составе целой клетки. Поэтому

широко обсуждаются вопросы, связанные с локализацией гликолитических ферментов в клетке (см. раздел 2.3.2) и, в частности, лактатдегидрогеназы.

Л-лактатдегидрогеназа (Л-лактат:NAD⁺-оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.27) — гликолитический фермент, относящийся к классу оксидоредуктаз. Он катализирует обратимое окисление Л-лактата до пирувата с использованием в качестве кофермента NAD⁺.

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) принадлежит к наиболее интенсивно изучаемым белкам, так как она является ключевым ферментом, функционирующим на «развилке» путей аэробного и анаэробного превращения углеводов в тканях.

Молекула ЛДГ представляет собой тетрамер, состоящий из субъединиц двух типов — Н и М (от англ. heart — сердце и muscle — мышца). Молекулярные массы тетрамера и каждой субъединицы составляют 140 и 35 кДа соответственно. Рекомбинация двух типов субъединиц дает различные изоформы фермента: гомотетрамеры Н₄ и М₄ и гибридные тетрамеры (гетеротетрамеры) Н₃М, Н₂М₂ и НМ₃. Это количество изоферментов обусловлено наличием двух генетических локусов, которые кодируют синтез субъединиц М и Н.

Субъединица М синтезируется главным образом в тканях с анаэробным метаболизмом, в то время как субъединица Н присутствует в тканях с преобладанием аэробных процессов. В цитозоле герминативных клеток, в частности в сперматозоидах, присутствует ЛДГ-Х, составляющая 80 % активности ЛДГ. Показано, что ЛДГ-Х также является тетрамером и состоит из субъединиц ЛДГ-Х, которые по аминокислотному составу отличаются от Н и М.

Изоферментам ЛДГ присущи разные кинетические характеристики, величины рН, при которых они проявляют максимальную активность, сродство к субстратам и кофакторам. Для определения относительного содержания изоферментов используют ряд физико-химических методов: электрофорез, ионообменную хроматографию, различия в кинетических параметрах отдельных изоферментов, дифференцированную чувствительность к субстратам и ингибиторам, иммунохимические методы.

Полипептидная цепь обеих субъединиц содержит 330 аминокислотных остатков; различия в их последовательности в субъединицах обнаружены на протяжении более чем 25 % длины полипептидной цепи.

В субъединицах фермента выделяют два домена: каталитический и центр связывания кофермента. Аминокислоты, образующие NAD^+ -связывающий домен, расположены в середине молекулы ЛДГ. Структура названного домена состоит из шести складчатых слоев ($\beta\text{A}—\beta\text{F}$), соединенных между собой α -спиралями.

Лактатдегидрогеназа связывает лактат или пируват только в присутствии кофермента, причем первым связывается кофермент. NAD^+ (NADH) находятся в гидрофобной полости в изогнутой конформации молекулы ЛДГ.

В каталитическом центре ЛДГ находятся полярные группы, участвующие в связывании кофермента и субстратов и катализе: остатки Arg 109, Arg 171, Arg 101, Glu 102, Asn 140, а также существенный остаток His 195, способный играть роль донора-акцептора H^+ в ходе реакции. Кроме того, для проявления активности фермента необходима сульфгидрильная группа, одна на субъединицу.

Оптимум pH для реакции восстановления пирувата в лактат — 6,5—7,5, а для обратной реакции — 8,5—9,0. Ингибируют фермент высокие концентрации NAD , фторпируват (необратимо), α -меркаптокислоты (конкурентно по отношению к лактату), сульфгидрильные реагенты. В последнем случае ингибирование предотвращается коферментом и снимается цистином и глутатионом.

Получены сведения о взаимодействии ЛДГ со структурными белками мышц и миофибриллами, субклеточными частицами, искусственными подложками, микросомами и мембранами саркоплазматического ретикулума.

Установлено, что взаимодействие ЛДГ с F-актином и нативным тонким филаментом приводит к уменьшению каталитической активности фермента. При связывании с F-актином происходит увеличение значения константы Михаэлиса для NADH и уменьшение максимальной скорости реакции. Для свободной и связанной форм ЛДГ выполняется уравнение Михаэлиса — Ментен. Предполагают, что обратимое взаимодействие изофермента M_4 ЛДГ с F-актином является специфическим и обусловлено образованием белок-белкового комплекса.

Исследование кинетических параметров ЛДГ в растворе и в суспензии гомогената субклеточных частиц скелетных мышц цыпленка позволило выявить, что изофермент ЛДГ H_4 не связывается субклеточными частицами, ЛДГ M_2 полностью и ЛДГ H_2M_2

частично находятся в связанном состоянии. Связывание изоферментов M_4 и H_2M_2 приводит к значительному снижению величины максимальной скорости реакции, а также константы Михаэлиса для пирувата.

При взаимодействии ЛДГ с митохондриальной фракцией и митохондриальным ингибитором из скелетных мышц кролика отмечено снижение активности фермента. Причем зависимость скорости реакции от концентрации субстратов для связанной ЛДГ была негиперболической, а зависимость $1/v$ от $1/[\text{пируват}]^{1/2}$ или $1/[\text{NADH}]^{3/2}$ была линейной.

Описано связывание ЛДГ M_4 с искусственными подложками, карбоксиметилцеллюлозой и декстрансульфатом. Взаимодействие ЛДГ из мышц свиньи с декстрансульфатом приводит к появлению положительной кооперативности по концентрации NADH, не характерной для фермента в растворе.

В. И. Луцак (1991) изучил физико-химические свойства ЛДГ, связанной с микросомальными мембранами из белых мышц шиповатого ската. Исследование кинетических характеристик для мембраносвязанного и изолированного ферментов показало, что константа Михаэлиса для данных форм (состояний) ЛДГ практически одинакова. В то же время данный показатель для NADH у связанного фермента в 4 раза ниже, чем у изолированного. Цитозольная форма ЛДГ из белых мышц шиповатого ската ингибируется наполовину при концентрации пирувата 14 ммоль/л, а связанная проявляет в этих условиях полную активность. Связанная ЛДГ обладает более высокой стабильностью, чем свободная: перевод фермента в раствор в 2,5—3,0 раза ускоряет процесс его инактивации трипсином. Такие факторы, как pH, ионная сила, субстраты и коферменты, влияют на процесс экстракции ЛДГ из микросом. При щелочных значениях pH удается солиubilизировать 48 % активности фермента, но не менее 20 % ЛДГ остается в мембраносвязанном виде. Степень экстрагируемости фермента из микросом возрастает по мере увеличения ионной силы раствора. При нейтральных значениях pH среды NADH экстрагирует 68 % ЛДГ. По-видимому, с микросомами из белых мышц шиповатого ската связано два пула ЛДГ. Фермент одного пула взаимодействует с мембраной за счет электростатических сил, фермент другого пула — за счет гидрофобных взаимодействий. Наличие двух пулов ЛДГ приводит к дополнительной возможности регуляции свойств фермента путем его пере-

распределения между разными клеточными компартментами.

Т. В. Есаковой и М. В. Ивановым (1992) показано, что связывание ЛДГ с мембранами саркоплазматического ретикулума ведет к снижению удельной активности фермента на 60—70 %. Высказано предположение о том, что взаимодействие фермента с мембранами происходит в участках с высоким и низким сродством. Добавление NADH , NAD^+ , а также повышение ионной силы раствора вызывает сольubilизацию связанного фермента. Снижение активности ЛДГ в связанном состоянии можно объяснить как маскировкой некоторых субъединиц, диффузионными затруднениями при связывании субстратов, конформационными перестройками молекулы ЛДГ, так и изменениями физико-химических свойств среды при переходе фермента из раствора в при-мембранный слой.

Взаимодействие мембран эритроцитов с ЛДГ приводит к снижению ее каталитической активности. На рис. 49 представлена зависимость ферментативной активности мембраносвязанной ЛДГ от величины рН среды инкубирования. В условиях оптимума рН 7,4 активность ее снижается на 25 %; при значениях рН 6,0 и 4,0 — соответственно на 33 и 46 %. Сдвиг рН в щелочную область приводит к уменьшению эффекта ингибирования ЛДГ. При рН 9,0 активности свободного и связанного ферментов статистически достоверно не отличаются.

По-видимому, с увеличением отрицательного заряда молекулы белка вероятность образования его комплекса с мембраной уменьшается. Можно предположить, что участки связывания фермента на мембране несут отрицательный заряд.

Эти данные коррелируют с результатами исследования

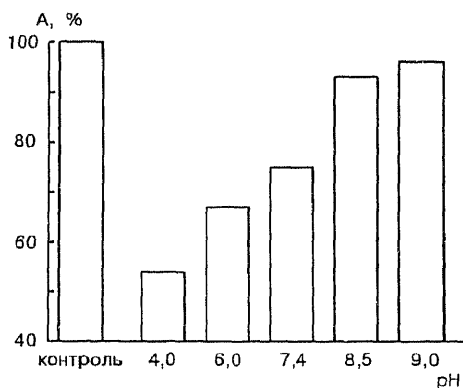


Рис. 49. Зависимость ферментативной активности лактатдегидрогеназы, связанной с мембранами эритроцитов ($2 \cdot 10^{-8}$ моль/л, 0,15 мг/мл белка мембран), от величины рН (за 100 % принята активность свободного фермента при тех же значениях рН)

В. И. Луцака (1991, 1992), который изучил влияние pH среды на экстракцию ЛДГ из микросом плавательных мышц шиповатого ската и показал, что степень экстрагируемости фермента из микросомальных мембран увеличивается при щелочных значениях pH. Т. В. Есакова и М. В. Иванов (1992) считают, что для взаимодействия ЛДГ из скелетных мышц свиньи с мембранами саркоплазматического ретикулула важен отрицательный заряд мембраны. Кроме того, на поверхности мембраны существует положительный заряд, затрудняющий связывание ЛДГ.

Падение активности фермента в связанном состоянии может быть обусловлено следующими причинами (Б. И. Курганов, Н. И. Лобода, 1977; Б. И. Курганов, 1984):

а) стерическим экранированием активных центров при адсорбции;

б) изменением конформационного состояния белковой молекулы (или преимущественной адсорбцией одной из конформационных форм фермента, находящегося в растворе);

в) изменением микроокружения фермента при переходе из раствора в примембранный слой (концентрации водородных ионов и субстратов в растворе и на поверхности могут различаться вследствие их взаимодействия с подложкой).

Однако убедительных доказательств в пользу какого-либо одного из этих предположений не получено.

Таким образом, процесс ассоциации ЛДГ с эритроцитарной мембраной можно регулировать путем варьирования значений pH среды. Следовательно, важную роль в образовании комплексов фермента с различными клеточными структурами играют электростатические взаимодействия.

При взаимодействии ЛДГ с теньями эритроцитов, обработанными тритоном X-100, наблюдалось снижение каталитической активности ЛДГ, однако степень инактивации фермента была выше, чем в случае его ассоциации с препаратами нативных мембран. Так, связывание ЛДГ с эритроцитарными мембранами и их "тритоновыми" теньями при pH 7,4 приводило к снижению ее активности на 25 и 82 % соответственно (рис. 50). При pH 9,0 каталитическая активность ЛДГ в присутствии нативных и тритоновых теней статистически достоверно не отличалась от таковой для свободного фермента. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что ЛДГ эффективнее взаимодействует со спектрин-активно-

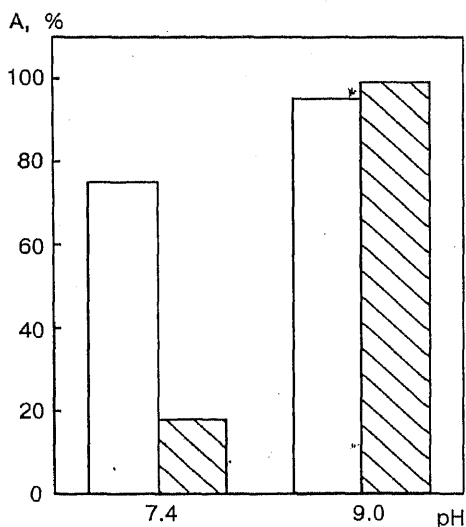


Рис. 50. Каталитическая активность лактатдегидрогеназы в комплексе с эритроцитарными мембранами и тритоновыми тенями эритроцитов ($2 \cdot 10^{-8}$ моль/л, 0,15 мг/мл белка мембран): — изолированные мембраны; — тритоновые тени

вой сетью, представляющей основу мембранного каркаса клетки. Можно предположить, что преобладающий вклад в образование комплекса фермента с эритроцитарной мембраной вносит его ассоциация с элементами цитоскелета, прежде всего актином и спектрином. Это соответствует концепции о центральной роли актина как белка-координатора в регуляции обменных процессов в клетке, предложенной Б. Ф. Поглазовым и соавт. (1983).

При взаимодействии эритроцитарной ЛДГ с нативными и модифицированными тритоном X-100 мембранами эритроцитов активность связанного фермента снижается при pH 7,4 на 21 и 30 %, а при pH 5,4 — на 35 и 41 % соответственно. Следовательно, изменения каталитической активности фермента из скелетных мышц и эритроцитов в ассоциированном с эритроцитарными мембранами состоянии имеют идентичный характер и указывают на единый механизм ассоциации мембран эритроцитов с ЛДГ из названных источников.

В присутствии восстановленного кофермента в среде инкубирования ЛДГ и мембран ее активность статистически достоверно не отличается от таковой для свободного фермента. Итак, полученные результаты можно объяснить тем, что NADH, соединяясь с апоферментом, вызывает его конформационные изменения, которые затрудняют адсорбцию фермента на подложке биологической природы. Эти данные согласуются с результатами ряда работ

(R. L. Melnick, H. O. Hultin, 1973; Г. Л. Ермаков, 1993; A. Dabrowska et al., 1989), в которых было показано, что NADH способствует десорбции фермента, связанного с мышечными волокнами лосося, липосомами и мембранами саркоплазматического ретикулума.

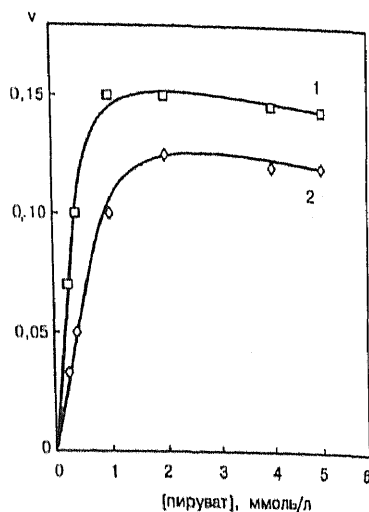
Ингибирование ЛДГ, ассоциированной с субклеточными частями, происходит за счет увеличения константы Михаэлиса для пирувата, а не изменения максимальной скорости реакции (A. Dabrowska et al., 1989). Н. П. Сугробовой и соавт. (1983) показано, что связывание ЛДГ с F-актином не изменяет характера зависимости скорости реакции от концентрации субстрата — α -кетоглутарата. В результате взаимодействия ЛДГ с F-актином максимальная скорость реакции снижается в 1,6 раза, а константа Михаэлиса увеличивается в 2,5 раза. Другие результаты получены при исследовании ЛДГ, ассоциированной с митохондриальной фракцией печени цыпленка (M. L. Sagrista, J. Bosal, 1987). Зависимость каталитической активности связанного фермента от концентрации пирувата отклоняется от гиперболической формы, а при изменении концентрации NADH описывается в рамках кинетики Михаэлиса—Ментен.

Считают, что имеющиеся в литературе противоречивые данные по этому вопросу можно объяснить двумя причинами: особенностями природы биологической подложки и природой самого фермента.

На рис. 51 показаны результаты исследования зависимости скорости ферментативной реакции ЛДГ, связанной с мембранами эритроцитов, от концентрации пирувата натрия при pH 7,4. Кинетические кривые для свободного фермента и комплекса фермент—мембрана подчиняются уравнению Михаэлиса—Ментен. Величина константы Михаэлиса для ЛДГ в растворе равна $0,25 \pm 0,02$ ммоль/л пирувата, а для мембраносвязанной — $0,60 \pm 0,04$ ммоль/л. Максимальная скорость ферментативной реакции при взаимодействии ЛДГ с мембраной эритроцитов снижается в 1,2 раза. Значит, ингибирование фермента происходит за счет увеличения в 2,4 раза константы Михаэлиса для пирувата натрия.

Суммируя результаты проведенных экспериментов, можно констатировать, что ассоциация ЛДГ с эритроцитарными мембранами и их белковыми компонентами, представляющими собой мембранный каркас клетки, при различных значениях pH среды приводит к снижению каталитической активности фермента, ко-

Рис. 51. Зависимость скорости ферментативной реакции лактатдегидрогеназы в свободном состоянии (1) и в комплексе с эритроцитарными мембранами (2) от концентрации пирувата натрия



торое происходит за счет увеличения константы Михаэлиса для пирувата натрия. Эффект ингибирования ЛДГ усиливается при сдвиге pH в кислую область, что свидетельствует об электростатической природе взаимодействий между ферментом и мембраной. Следовательно, процесс образования комплекса ЛДГ с биологической подложкой можно регулировать путем варьирования концентрации водородных ионов, а также добавления в реакционную среду кофермента NADH.

Обратимое взаимодействие белков-ферментов с различными структурными компонентами клетки представляет собой один из эффективных механизмов регуляции каталитической активности компонентов метаболических систем. В соответствии с этим функционирование ферментов в клетке можно рассматривать как совокупность взаимосвязанных процессов перехода их из свободного состояния в связанное, которые регулируются путем воздействия различных физико-химических факторов и сопровождаются изменением функциональных свойств этих ферментов, а, следовательно, и изменением жизнедеятельности целой клетки.

На рис. 52, а представлены результаты исследования каталитической активности ЛДГ, УФ-облученной в дозе 1,5 кДж/м² и ассоциированной с эритроцитарными мембранами при pH 7,4. Активность фермента в свободном состоянии после его облучения составляет 83 % по отношению к контрольному образцу.

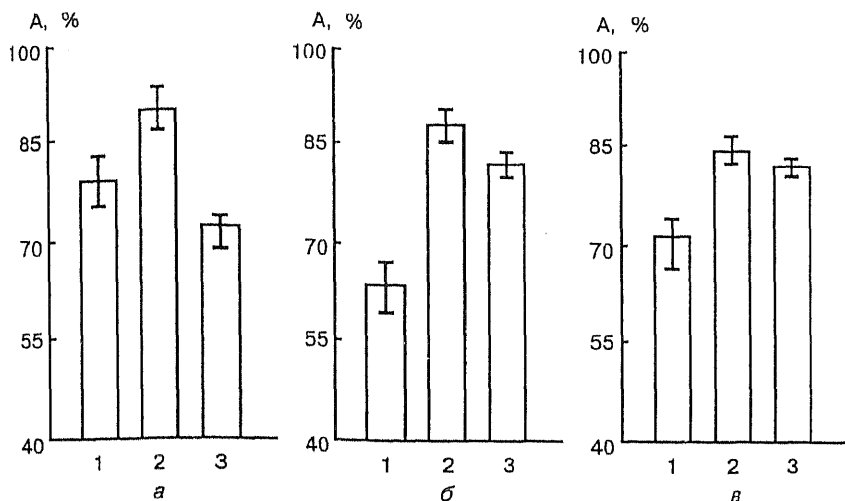


Рис. 52. Активность лактатдегидрогеназы, УФ-облученной в дозе 1,5 кДж/м², в комплексе с эритроцитарными мембранами при рН 7,4 (а), 5,4 (б), 4,5 (в): 1 — активность УФ-облученной ЛДГ; 2 — активность ЛДГ в присутствии эритроцитарных мембран; 3 — активность ЛДГ, УФ-облученной в дозе 1,5 кДж/м² и ассоциированной с эритроцитарными мембранами

Каталитическая активность УФ-модифицированной ЛДГ, ассоциированной с эритроцитарными мембранами, статистически достоверно уменьшается на 8 % по сравнению с активностью свободного УФ-облученного фермента.

Таким образом, степень инактивации УФ-модифицированной ЛДГ при рН 7,4 в связанном с эритроцитарными мембранами состоянии выше, чем в свободном состоянии (табл. 13).

На рис. 52, б приведены результаты исследования каталитической активности ЛДГ, модифицированной УФ-излучением и ассоциированной с эритроцитарными мембранами при рН 5,4. Активность фермента в свободном состоянии после его УФ-облучения составляет 65 % по отношению к контрольному образцу. Каталитическая активность УФ-облученной ЛДГ и ассоциированной с эритроцитарными мембранами увеличивается на 21 % по сравнению с каталитической активностью УФ-облученного свободного фермента.

Другими словами, степень инактивации ЛДГ, УФ-облученной и связанной с эритроцитарными мембранами, при рН 5,4 ниже, чем при облучении свободного фермента (см. табл. 13).

Таблица 13

Степень инаktivации ЛДГ, УФ-облученной при рН 7,4; 5,4; 4,5 в свободном состоянии и в комплексе с эритроцитарными мембранами

рН	Степень инаktivации $\Delta A = A_{\text{нат}} - A_{\text{обл}}$, %	
	в свободном состоянии	в связанном с эритроцитарными мембранами состоянии
7,4	17	21
5,4	35	6
4,5	14	2

Примечание. $A_{\text{нат}}$ — каталитическая активность ЛДГ в нативном состоянии; $A_{\text{обл}}$ — каталитическая активность УФ-облученной ЛДГ; ΔA — разность величин каталитической активности ЛДГ в нативном и УФ-облученном состояниях.

На рис. 52, в показаны результаты исследования каталитической активности ЛДГ, УФ-облученной и ассоциированной с эритроцитарными мембранами при рН 4,5. Каталитическая активность УФ-облученной ЛДГ в комплексе с эритроцитарными мембранами при этом значении рН статистически достоверно увеличивается на 12 % по сравнению с активностью свободного УФ-облученного фермента. Степень инаktivации ЛДГ, модифицированной УФ-светом и связанной с эритроцитарными мембранами, оказывается ниже, чем при облучении свободного фермента (см. табл. 13).

Следовательно, степень инаktivации ЛДГ, УФ-облученной и ассоциированной с эритроцитарными мембранами, при рН 4,5 и 5,4 уменьшается по сравнению с таковой для УФ-модифицированного свободного фермента при тех же значениях рН.

Можно предположить, что такое изменение функциональной активности ЛДГ, модифицированной воздействием УФ-света и ассоциированной с эритроцитарными мембранами, может быть связано с изменением микроокружения активного центра УФ-облученного фермента при его адсорбции на мембране.

Вероятно, УФ-модификация и ассоциация ЛДГ с эритроцитарной мембраной при рН 7,4 приводит к стерическому экранированию активных центров ЛДГ, а при рН 5,4 и 4,5 создаются более оптимальные условия для катализа. Но нельзя исключить и то обстоятельство, что при УФ-облучении и последующей иммобилизации фермента на мембране происходит изме-

нение участков его локализации на подложке биологической природы.

С целью проверки справедливости высказанных предположений были исследованы флуоресцентные свойства 1-анилина-фталин-8-сульфоната в комплексе с мембранами эритроцитов и ЛДГ, УФ-облученной при значениях рН 7,4; 5,4 и 4,5.

На рис. 53 представлены результаты исследования значений интенсивности в максимуме флуоресценции АНС (479 нм) в присутствии мембран эритроцитов и ЛДГ, модифицированной воздействием УФ-облучения при рН 7,4; 5,4 и 4,5.

Из анализа рисунка следует, что при взаимодействии эритроцитарных мембран с ЛДГ, облученной УФ-светом при указанных значениях рН, не выявляются статистически достоверные отличия значений интенсивности флуоресценции зонда в комплексе "мембраны — ЛДГ в нативном состоянии" и в комплексе "мембраны — УФ-облученный фермент".

Полученные данные, вероятно, указывают на то, что при УФ-облучении фермента не происходит модификация тех его участков, которые ответственны за связывание с эритроцитарными мембранами.

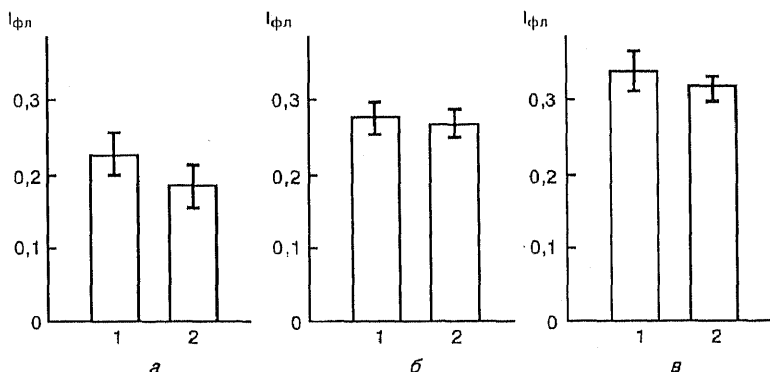


Рис. 53. Интенсивность флуоресценции зонда 1,8-АНС в комплексе с эритроцитарными мембранами и ЛДГ, модифицированной УФ-излучением, при рН 7,4 (а), 5,4 (б), 4,5 (в): 1 — интенсивность флуоресценции АНС в комплексе с эритроцитарными мембранами и ЛДГ в нативном состоянии; 2 — интенсивность флуоресценции АНС в комплексе с эритроцитарными мембранами и УФ-облученным ферментом

4.4. ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ПРОЦЕССАХ УФ-МОДИФИКАЦИИ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ*

В настоящее время возрос интерес исследователей к проблеме окислительного стресса. Ключевую роль в развитии окислительного повреждения играют активные формы кислорода (АФК): синглетный молекулярный кислород $^1\text{O}_2$, супероксидный анион-радикал, пероксид водорода H_2O_2 , гидроксильный радикал $\text{OH}^\cdot$, пергидроксильный радикал, гипогалоиды (см. разделы 3.2, 3.3). Образование АФК и оксидативная модификация макромолекул — нормальные и важные регуляторные процессы, участвующие в синтезе эйкозаноидных гормонов (простаноидов и лейкотриенов) и иодтиронинов, в воспалительных и иммунологических реакциях. В норме организм имеет мощную антиоксидантную (защитную) систему, но при различных патологических состояниях и действии экстремальных факторов (избыток O_2 , активация нейтрофилов и фагоцитов, избыток гема, ионов Fe^{2+} и Cu^{2+} , ионизирующее и УФ-излучение, некоторые ксенобиотики) необходимо предусматривать дополнительные меры, повышающие устойчивость макромолекул (белков и нуклеиновых кислот) к оксидативной модификации и, в частности, фотоокислению.

Существенную роль в процессах темнового и фотоокисления биологических структур играют синглетный кислород и радикал гидроксила, обладающие наибольшим модифицирующим эффектом. Одним из широко используемых методов исследования роли тех или иных активных интермедиатов в процессе УФ-модификации белка является элиминирование их при помощи специфических акцепторов и тушителей.

Рассмотрим более подробно результаты исследования фотоиндуцированных изменений структурно-функциональных свойств изоферментов лактатдегидрогеназы из различных источников в интактном состоянии и в присутствии ряда химических соединений, способных взаимодействовать с активными формами кислорода.

Каталитическая активность растворов изофермента M_4 ЛДГ ($0,2 \cdot 10^{-8}$ моль/л) из скелетных мышц свиньи при действии УФ-света (240—390 нм) в дозах 0,15—4,53 кДж/м² снижается с ростом дозы облучения (В. Г. Артюхов и соавт., 1997, В. Г. Артю-

* Раздел написан с участием Ю. А. Лысенко и Н. В. Агишевой.

хов, М. А. Наквасина, 1991). NADH ($2,4 \cdot 10^{-7}$ моль/л) оказывает фотосенсибилизирующее действие по отношению к молекулам фермента при УФ-облучении их смеси. Падение каталитической активности ЛДГ происходит под влиянием УФ-излучения, поглощаемого как апоферментом ($\lambda \leq 280$ нм), так и коферментом ($\lambda \geq 260$ нм). По-видимому, в процесс фотоинактивации ЛДГ вносят вклад преимущественно фотохимические превращения апо-белка, связанные с поглощением энергии УФ-света остатками ароматических (триптофана, тирозина — входит в активный центр ЛДГ, фенилаланина) и серосодержащих аминокислот белка. Присутствие указанных аминокислотных остатков в молекуле мышечной изоформы фермента было продемонстрировано при исследовании ее аминокислотного состава (табл. 14).

Т а б л и ц а 1 4

*Содержание отдельных аминокислот
в молекуле лактатдегидрогеназы*

Аминокислоты	Количество, % на 100 г белка	Аминокислоты	Количество, % на 100 г белка
Asp	7,820	Met	3,693
Thr	4,250	Ile	4,819
Ser	3,294	Leu	10,579
Glu	9,640	Tyr	3,793
Pro	6,273	Phe	4,078
Gly	4,006	His	2,937
Ala	4,092	Trp	2,068
"Полуцистин"	1,141	Lys	9,610
Val	8,626	Arg	6,388

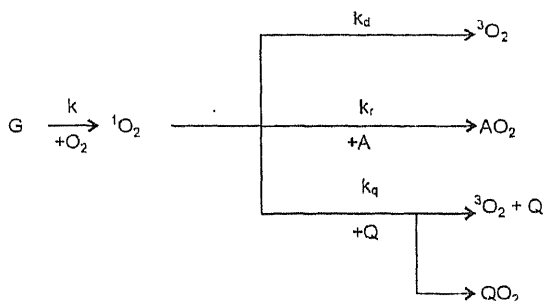
Наблюдаемые при воздействии УФ-света нарушения структурного состояния и функциональной активности ЛДГ являются результатом разворачивания белковой глобулы, что находит отражение в изменении оптических и гель-хроматографических свойств УФ-облученного фермента.

Продуктом фотодеградации остатков триптофана являются кинуренины и формилкинуренины. Показано, что производные триптофана способны выполнять функцию фотодинамических сенситизаторов, в частности, генерировать синглетный кислород. В качестве источника $^1\text{O}_2$ рассматривают процессы тушения кислородом триплетных состояний ароматических или карбонильных соединений, которые входят в

состав макромолекул или присутствуют в них в виде примесей. На потенциальную возможность генерации $^1\text{O}_2$ в реакции триплетных возбужденных состояний белков указывает И. И. Сапежинский (1979). Образование синглетного кислорода может происходить в короткоживущих комплексах с переносом заряда: ароматический углеводород (аминокислотный остаток) — кислород.

С целью получения дополнительной информации о механизме фотопревращений ЛДГ необходимо исследовать УФ-индуцированные изменения структурно-функциональных свойств и кинетики фотоинактивации различных изоферментов ЛДГ в широком спектральном диапазоне УФ-излучения для выяснения возможного участия модифицированных триптофанилов в качестве «внутримолекулярных аутосенситизаторов». Для изучения роли активных кислородных метаболитов в процессах УФ-превращений белка используют их специфические акцепторы и тушители: азид натрия, D-маннит, β -каротин, гистидин, серотонин. Применяемые концентрации вышеуказанных соединений не должны оказывать заметного влияния на уровень активности нативного фермента.

Распространенным тушителем синглетного кислорода является азид натрия, защитное действие которого было продемонстрировано по отношению к сенситилизованному окислению различных органических субстратов. Константа скорости его реакции с $^1\text{O}_2$ — $2 \cdot 10^8 \text{ л} \cdot (\text{моль} \cdot \text{с})^{-1}$, $2 \cdot 10^9 \text{ л} \cdot (\text{моль} \cdot \text{с})^{-1}$. Азид натрия тушит триплетные состояния возбужденных молекул, но константа скорости данной реакции в последнем случае на 2 порядка ниже. Для подбора концентрации NaN_3 можно использовать предположение о простом конкурентном перехвате синглетного кислорода в исследуемой модельной системе и в соответствии с известными константами скорости взаимодействия $^1\text{O}_2$ с компонентами этой системы. Для ЛДГ такая константа не определена, но в первом приближении можно принять ее значения равными 10^9 — $10^{10} \text{ л} \cdot (\text{моль} \cdot \text{с})^{-1}$ (И. И. Сапежинский, 1988). Суммируя известные литературные данные (Б. Рэнби, Я. Рабек, 1978, В. Я. Шляпинтох, 1979, Х. Фут, 1979, Н. А. Шинкаренко, В. Б. Алесковский, 1981, Ю. А. Владимиров, А. Я. Потапенко, 1989), взаимодействие синглетного кислорода с возможными субстратами реакции может быть представлено с помощью следующей упрощенной формально-кинетической схемы:



где G — источник, генерирующий ${}^1\text{O}_2$; k_d — константа дезактивации ${}^1\text{O}_2$ растворителем; k_r — константа скорости реакции ${}^1\text{O}_2$ с акцептором (окисляемым веществом); k_q — константа скорости тушения (или химического взаимодействия) с потенциальным протектором.

В присутствии двух конкурирующих за ${}^1\text{O}_2$ соединений (A и Q) квантовый выход окисления акцептора определяется по уравнению

$$\frac{1}{\Phi_{\text{AO}_2}} = \frac{1}{\Phi_{{}^1\text{O}_2}} \left(1 + \frac{k_d + k_q[Q]}{k_r[A]} \right).$$

Реакционная способность органического соединения и тушителя характеризуется параметрами: $\beta_A = k_d/k_r$ и $\beta_Q = k_d/k_q$. Эффективная защита молекулы от повреждающего действия ${}^1\text{O}_2$ в присутствии тушителя возможна при соблюдении условия $k_q[Q] \gg k_d + k_r[A]$. Следовательно,

$$[Q] \gg \frac{k_d}{k_q} + \frac{k_r}{k_q}[A] \quad \text{и} \quad [Q] \gg \beta_Q + \frac{k_r}{k_q}[A]$$

Время жизни ${}^1\text{O}_2$ в H_2O составляет 3,1–3,2 мкс, значит, $k_d = 1/\tau = (3,2 \pm 3,1) \cdot 10^5 \text{ с}^{-1}$. Если принять k_r для азида натрия — $2 \cdot 10^8 + 2 \cdot 10^9 \text{ л} \cdot (\text{моль} \cdot \text{с})^{-1}$, k_r (ЛДГ) — $10^9 + 10^{10} \text{ л} \cdot (\text{моль} \cdot \text{с})^{-1}$, то получаем:

$$\beta(\text{NaN}_3) = 1,6 \cdot 10^{-3(-4)},$$

$$[\text{NaN}_3] \gg 1,6 \cdot 10^{-3(-4)} + \frac{10^{9(10)}}{2 \cdot 10^{8(9)}} \cdot [\text{ЛДГ}].$$

Величина второго слагаемого в правой части неравенства будет пренебрежимо мала по сравнению с первым до значений концентраций фермента $\sim 10^{-6} \text{ моль/л}$. Следовательно, в этом случае

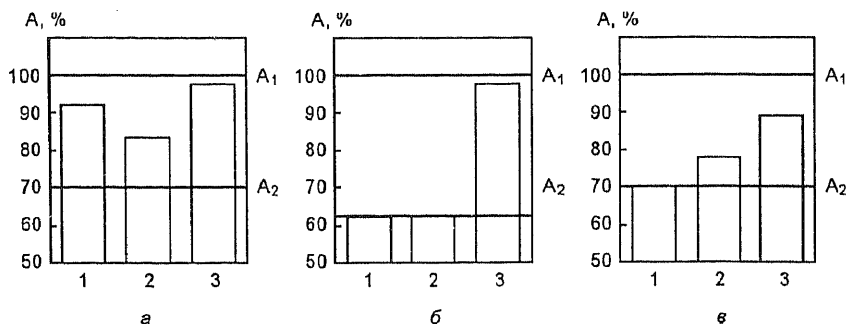


Рис. 54. Изменение фоточувствительности ЛДГ в присутствии азид натрия (а), β -каротина и D-маннита (б), гистидина (в). По оси абсцисс — концентрации модификаторов, моль/л; по оси ординат — ферментативная активность, %. A_1 — активность нативного фермента, A_2 — УФ-облученного фермента. Концентрации модификаторов: а) 1 — $6,6 \cdot 10^{-5}$ моль/л; 2 — $6,6 \cdot 10^{-4}$ моль/л; 3 — $3,2 \cdot 10^{-3}$ моль/л; б) 1 — $3,3 \cdot 10^{-5}$ моль/л (β -каротин); 2 — $5,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л (D-маннит); 3 — β -каротин + D-маннит; в) 1 — $1,3 \cdot 10^{-3}$ моль/л; 2 — $1,3 \cdot 10^{-2}$ моль/л; 3 — $3,3 \cdot 10^{-2}$ моль/л

концентрация азид натрия для проявления фотопротекторного эффекта должна превышать $1,6 \cdot 10^{-3(4)}$ моль/л.

Эти теоретические расчеты были подтверждены результатами экспериментов по изучению УФ-чувствительности (доза облучения — $2,27 \text{ кДж/м}^2$) изофермента M_4 ЛДГ ($2 \cdot 10^{-8}$ моль/л) в присутствии азид натрия в концентрациях $6,6 \cdot 10^{-5}$; $6,6 \cdot 10^{-4}$; $3,2 \cdot 10^{-3}$ моль/л (рис. 54, а). Из анализа рисунка следует, что NaN_3 в концентрации $3,2 \cdot 10^{-3}$ моль/л практически полностью восстанавливает ферментативную активность исследуемого белка. При изучении спектрально-люминесцентных характеристик ЛДГ (10^{-6} моль/л) после ее облучения в свободном состоянии и в присутствии азид натрия ($3,2 \cdot 10^{-3}$ моль/л) выявлено, что воздействие УФ-света на смесь фермент-азид натрия приводит к восстановлению до уровня контрольного образца величин интенсивности люминесценции модифицированного белка в его максимуме (340 нм) и светопоглощения в минимуме (250 нм) и в более длинноволновой области ($>290 \text{ нм}$), что связано, вероятно, с защитой хромофорных групп ЛДГ от действия УФ-излучения.

На рис. 55, а показаны кривые зависимости остаточной ферментативной активности мышечной изоформы ЛДГ от времени облучения. Для количественного описания данного процес-

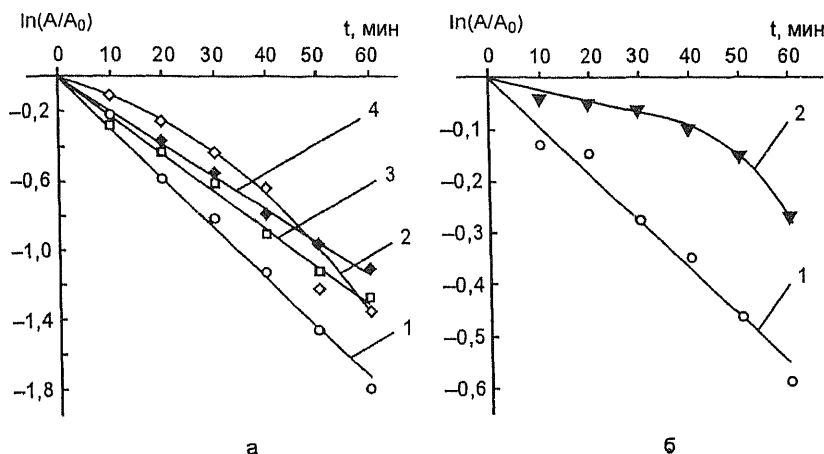


Рис. 55. Кинетические кривые фотоинактивации лактатдегидрогеназы из мышц (а) и сердца (б) свиньи в присутствии некоторых фотопротекторов: а) 1 — нативная ЛДГ; ЛДГ, УФ-облученная в присутствии модификаторов: 2 — азида натрия ($3,2 \cdot 10^{-3}$ моль/л); 3 — D-маннита ($5,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л); 4 — серотонина ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л); б) 1 — нативная ЛДГ; 2 — ЛДГ, УФ-облученная в присутствии азида натрия ($3,2 \cdot 10^{-3}$ моль/л)

са мы использовали константы фотоинактивации (k_f), рассчитанные по тангенсу угла наклона линейной анаморфозы исходной кривой «доза — эффект» в координатах $[\ln(A/A_0); t]$. Для нативной ЛДГ k_f оказалась равной $5,39 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$. Экспоненциальный характер кривой фотоинактивации свидетельствует об отсутствии процессов реактивации УФ-модифицированного белка и позволяет отнести последовательность фотохимических реакций ЛДГ к категории мономолекулярных реакций первого порядка. Время полупревращения ЛДГ (период, в течение которого каталитическая активность белка уменьшается на 50 %) в этом случае составит: $t_{1/2} = \ln 2/k = 0,693/k = 1286 \text{ с} = 21 \text{ мин}$. При концентрации фермента $0,2 \cdot 10^{-8}$ моль/л («преддиссоциационной») форма кинетической кривой фотоинактивации не изменяется, однако k_f существенно увеличивается и становится равной $3,05 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$, а $t_{1/2} = 227,2 \text{ с} = 3,8 \text{ мин}$. Следовательно, УФ-чувствительность ЛДГ возрастает при разведении ее растворов.

Добавление азида натрия ($3,2 \cdot 10^{-3}$ моль/л) при облучении раствора изоформы M_4 ЛДГ ($2 \cdot 10^{-8}$ моль/л) вызывает частичное восстановление каталитической активности фермента. Однако

дозовая зависимость описывается прямой, а в полулогарифмических координатах — квадратичной функцией (см. рис.55, а). Это свидетельствует о постоянстве скорости инактивации ЛДГ в изучаемом диапазоне. Таким образом, протекторный эффект NaN_3 на разных стадиях фотомодификации фермента неодинаков. Защитное действие азида натрия может быть обусловлено тушением $^1\text{O}_2$, а также его комплексированием с белковой макромолекулой и, возможно, образованием внутримолекулярных сшивок некоторых функциональных групп ЛДГ, что индуцирует повышение фоторезистентности зафиксированной конформации биополимера. Не исключено также тушение азидом натрия возбужденных состояний белка и его взаимодействие со свободными радикалами, образующимися в процессе УФ-модификации молекул фермента.

На рис. 55, б представлена зависимость «доза — эффект» для изоформы ЛДГ из сердца свиньи в полулогарифмических координатах. Эта зависимость удовлетворительно описывается прямой. Константа скорости инактивации фермента составляет $1,41 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ и $t_{1/2} = 1690 \text{ с} = 28 \text{ мин}$, что позволяет сделать вывод о меньшей фоточувствительности изофермента H_4 по сравнению с M_4 . При добавлении к раствору ЛДГ до облучения азид натрия остаточная ферментативная активность оказалась выше таковой для облученной в соответствующих дозах свободной изоформы (см. рис. 55, б).

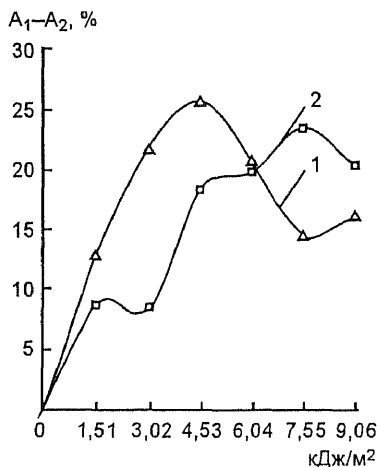


Рис. 56. Сравнение протекторного эффекта азид натрия по отношению к сердечной и мышечной изоформам ЛДГ при различных дозах УФ-облучения: 1 — протекторный эффект NaN_3 для мышечной изоформы; 2 — для сердечной изоформы. По оси ординат отложена разность между уровнями ферментативной активности ЛДГ, УФ-облученной в смеси с азидом натрия (A_1) и в свободной форме (A_2).

На рис. 56 представлена зависимость протекторного эффекта азида натрия от дозы УФ-облучения по отношению к мышечной и сердечной изоформам ЛДГ. Анализ полученных данных позволяет сделать заключение о неоднаправленном характере действия модификатора: максимальное защитное действие азида натрия наблюдается для ЛДГ (M_4) при дозах облучения 3,02—6,04 кДж/м², а по отношению к ЛДГ (H_4) — 6,04—9,06 кДж/м². Если предположить, что основной вклад в фотопротекторный эффект NaN_3 вносит процесс тушения $^1\text{O}_2$, то этот активный интермедиат оказывает влияние на изменение ферментативной активности изоформ ЛДГ при вышеуказанных дозах облучения.

Наиболее широко распространено представление о том, что дезактивация $^1\text{O}_2$ β -каротином, взаимодействующим с ним преимущественно по физическому механизму, связана с переносом энергии от синглетного кислорода на низколежащий триплетный уровень каротина. Обсуждается вопрос о вкладе в рассматриваемый процесс комплекса с переносом заряда между $^1\text{O}_2$ и каротином. Константа скорости дезактивации синглетного кислорода близка к диффузионной и составляет для CCl_4 $7 \cdot 10^9$ л·(моль·с)⁻¹. Гистидин относят к типу акцепторов $^1\text{O}_2$; его дезактивация осуществляется химическим путем. Константа скорости k_q для этой аминокислоты составляет $5 \cdot 10^7$ л·(моль·с)⁻¹ в метаноле; в D_2O — 10^8 л·(моль·с)⁻¹. В реакцию с $^1\text{O}_2$ вступает только непротонированная форма гистидина. Из анализа рис. 54, б следует, что β -каротин в концентрации $3,3 \cdot 10^{-5}$ моль/л оказывает защитное действие по отношению к молекулам ЛДГ (M_4): активность УФ-облученного в дозе 2,27 кДж/м² белка восстанавливается на 18 % по сравнению с таковой в отсутствие протектора. Гистидин в концентрации $3,3 \cdot 10^{-2}$ моль/л снижает степень инактивации ЛДГ на 19 % (см. рис. 54, в), что согласуется с данными, полученными при использовании β -каротина.

Облучение ЛДГ в присутствии D-маннита, являющегося акцептором ОН-радикалов, сопровождается снижением ее фоточувствительности: константа инактивации составила $4,0 \cdot 10^{-4}$ с⁻¹, а $t_{1/2} = 1732$ с = 29 мин (рис. 55, а). Дозовая кривая имеет экспоненциальный характер. При изучении сочетанного воздействия β -каротина и D-маннита на уровень активности УФ-облученной ЛДГ выявлен четко выраженный эффект аддитивности действия этих агентов (рис. 54, в). Полученные результаты свидетельствуют о том, что их протекторное действие связано с реализацией

различных каналов защиты белка от УФ-повреждения: элиминированием $^1\text{O}_2$ и ОН-радикалов.

При УФ-облучении ЛДГ (M_1) из скелетных мышц свиньи в присутствии серотонина установлено его фотопротекторное действие по отношению к молекулам этой изоформы: $k_t = 3,5 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ и $t_{1/2} = 1980 \text{ с} = 33 \text{ мин}$ (см. рис. 55, а).

На рис. 57 показаны фотоиндуцированные изменения функциональных свойств ЛДГ (изоферменты H_4 , H_3M , H_2M_2) эритроцитов крови человека после УФ-облучения в присутствии серотонина. Введение в облучаемую систему экзогенного агента в концентрации 10^{-8} моль/л приводит к проявлению его защитного действия только при использовании максимальной дозы УФ-света ($4,53 \text{ кДж/м}^2$), вызывающей наиболее глубокие изменения в структуре молекулы фермента и приводящей к падению его активности на 35 % по сравнению с контрольным образцом. Увеличение концентрации серотонина до 10^{-7} моль/л индуцирует резкое усиление его фотопротекторного эффекта, наиболее ярко проявляющегося при облучении ЛДГ в дозах 1,51 и $4,53 \text{ кДж/м}^2$. При использовании биогенного амина в концентрации 10^{-6} моль/л отмечается снижение его защитного действия при воздействии УФ-излучения в дозах 1,51 и $4,53 \text{ кДж/м}^2$ по отношению к этому показателю при концентрации серотонина 10^{-7} моль/л. Протекторный эффект 5-окситриптамина может быть связан либо с акцепцией различных активных интермедиатов, в том числе и $^1\text{O}_2$, либо с образованием комплекса фермент — биогенный амин, более фоторезистентного, чем свободный белок.

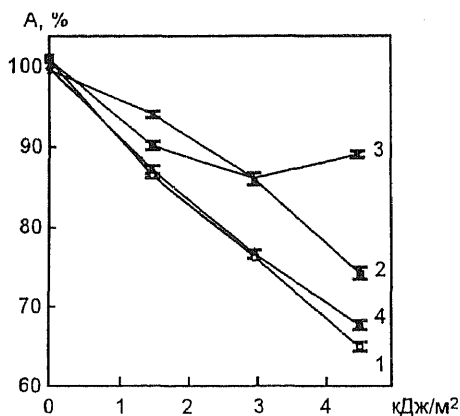


Рис. 57. Зависимость уровня каталитической активности лактатдегидрогеназы эритроцитов человека в свободном состоянии и в присутствии серотонина от дозы УФ-облучения: 1 — УФ-облучение без модификатора; 2 — в присутствии серотонина: 2 — в концентрации 10^{-6} моль/л, 3 — 10^{-7} моль/л, 4 — 10^{-8} моль/л

С целью детализации представлений, касающихся выяснения механизма защитного действия серотонина по отношению к молекулам ЛДГ, при помощи метода ИК-спектрофотометрии были исследованы особенности вторичной структуры изофермента M_4 из скелетных мышц свиньи в нативном состоянии и в присутствии биогенного амина.

Анализ соотношения интенсивностей поглощения в полосах амид I и амид II на частотах, являющихся характеристическими для отдельных элементов вторичной структуры, свидетельствует о том, что присутствие биогенного амина индуцирует увеличение доли беспорядочной структуры в молекуле фермента (табл. 15). При этом отмечаемый прирост ее реализуется за счет как α -спиральных участков, так и β -складчатых слоев. В случае соотношения молекул ЛДГ и экзогенного модификатора 1:1 наблюдаемый эффект в большей степени обусловлен участием α -спиралей, входящих в состав белка.

Таблица 15

Соотношение полос поглощения, характеризующих основные типы вторичной структуры белковой молекулы, для лактатдегидрогеназы в свободном состоянии и в присутствии серотонина

Соотношение интенсивностей полос поглощения	Исследуемые образцы		
	Нативный белок	ЛДГ + серотонин в соотношении молекул 1:1	ЛДГ + серотонин в соотношении молекул 1:10
1656 (беспорядочная структура): 1650 (α -спираль) см^{-1}	$1,423 \pm 0,092$	$1,406 \pm 0,021$	$1,596 \pm 0,107$
1535 (беспорядочная структура): 1516 (α -спираль) см^{-1}	$1,488 \pm 0,092$	$2,297 \pm 0,078^*$	$1,658 \pm 0,109$
1685 (β -складки): 1656 (беспорядочная структура) см^{-1}	$0,926 \pm 0,007$	$0,932 \pm 0,028$	$0,752 \pm 0,040^*$
1550 (β -складки) : 1535 (беспорядочная структура) см^{-1}	$1,342 \pm 0,058$	$1,072 \pm 0,029^*$	$1,160 \pm 0,033^*$
1650 (α -спираль): 1685 (β -складки) см^{-1}	$0,746 \pm 0,050$	$0,756 \pm 0,029$	$0,754 \pm 0,046$
1516 (α -спираль): 1550 (β -складки) см^{-1}	$0,538 \pm 0,029$	$0,407 \pm 0,009^*$	$0,535 \pm 0,019$

* Отличие от контроля статистически достоверно.

Изменение спектральных характеристик фермента удается обнаружить и на других участках спектра. При соотношении молекул ЛДГ и серотонина 1:1 статистически достоверно уменьшается интенсивность поглощения образцов на частотах 1468, 1420 см^{-1} по сравнению с нативным белком; отмечается появление нового максимума на частоте 1502 см^{-1} .

Повышение концентрации экзогенного модификатора в 10 раз сопровождается снижением интенсивности поглощения на частоте 1432 см^{-1} . Вместе с тем в области 1440—1380 см^{-1} регистрируется выраженный пик с максимумом при 1404 см^{-1} . Для нативного белка поглощение в этом участке незначительно, а при соотношении компонентов изучаемой системы 1:1 практически отсутствует. ИК-спектр свободного фермента характеризуется наличием широкой полосы поглощения в области 1370—1180 см^{-1} . Добавление к его раствору серотонина приводит к ее сглаживанию и при соотношении молекул ЛДГ — биогенный амин 1:10 в данном диапазоне отмечается практически монотонное убывание светопропускания образца.

Таким образом, выявлен выраженный фотопротекторный эффект серотонина по отношению к молекулам изоферментов H_4 , H_3M , H_2M_2 ЛДГ эритроцитов человека, обусловленный образованием комплекса ЛДГ — серотонин, формирование которого затрагивает вторичную структуру белка. Возможно, комплексообразование биогенного амина с молекулами фермента происходит и в растворе. Однако полученные результаты не исключают и вероятность дезактивации серотонином АФК, в том числе $^1\text{O}_2$.

Динамический комплекс с молекулами ЛДГ способен образовывать и его кофактор NADH, что может существенно изменять фоточувствительность фермента. С целью расширения представлений, касающихся выявления механизма УФ-модификаций ЛДГ в присутствии кофермента, были проведены эксперименты по изучению фотостабильности молекул ЛДГ (M_4) из скелетных мышц свиньи в условиях различной занятости ее активных центров этим кофактором. Степень занятости активных центров фермента NADH рассчитывали по формуле (Ч. Кантор, П. Шиммел, 1985):

$$Y = \frac{[\text{NADH}]}{K_{\text{dis}} + [\text{NADH}]},$$

где Y — степень насыщения белка лигандом; $[\text{NADH}]$ — концентрация кофактора; K_{dis} — константа диссоциации комплекса бе-

лок — лиганд (в качестве $K_{\text{дис}}$ использовали значение константы Михаэлиса $2,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л для NADH по отношению к изоформе M_1) (С. Е. Северин, Г. А. Соловьева, 1989) .

Установлено, что предварительное добавление NADH ($4 \cdot 10^{-8}$ моль/л) к ЛДГ (10^{-8} моль/л), УФ-облучаемой в дозе $3,02$ кДж/м², не вызывает статистически достоверных изменений степени инактивации свободного белка (32 %). У в данном случае — 0,16 %. При концентрации NADH $4 \cdot 10^{-7}$ моль/л ($Y = 1,57$ %) обнаруживается эффект сенсibilизации (13 %). Фотомодификация ЛДГ в присутствии кофермента в концентрациях $4 \cdot 10^{-6}$ ($Y = 13,8$ %) и $2,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л ($Y = 50$ %) приводит к регистрации протекторного эффекта NADH по отношению к ферменту: степень УФ-инактивации белка в этом случае соответственно на 9,3 и 16,0 % ниже уровня активности ЛДГ, облученной без кофактора.

Путем одноэлектронного окисления NADH и при восстановлении NAD^+ может образовываться радикал $\text{NAD}^\bullet$, взаимодействующий с кислородом с образованием супероксидного анион-радикала $\text{O}_2^{\bullet -}$, поражающего белковую глобулу. Вместе с тем восстановленная форма кофактора обладает способностью дезактивировать $^1\text{O}_2$: константа скорости тушения синглетного кислорода в системе $\text{CH}_3\text{CN} : \text{D}_2\text{O}$ (4:1) — $7,5 \cdot 10^7$ л·(моль·с)⁻¹; в D_2O — $2,1 \cdot 10^7$ л·(моль·с)⁻¹. Следовательно, значение ее для NADH составляет $1,7 \cdot 10^{-4}$ — $1,5 \cdot 10^{-2}$ моль/л. NADH способен взаимодействовать с $\text{O}_2^{\bullet -}$, причем выявлено, что его окисление супероксидом идет быстрее, если кофактор образует комплекс с ЛДГ: константа скорости окисления NADH в последнем случае по меньшей мере на 4 порядка выше таковой для свободного лиганда. Окисление NADH в активном центре фермента, по-видимому, должно происходить по цепному механизму и существенным образом изменять химические свойства кофактора.

Спектр поглощения комплекса ЛДГ ($2 \cdot 10^{-6}$ моль/л) — NADH ($2 \cdot 10^{-8}$ моль/л) характеризуется двумя полосами поглощения с λ_{max} при 268 и 340 нм. Присутствие полосы с λ_{max} 268 нм в спектре поглощения изучаемой системы можно объяснить индукцией структурных изменений молекулы апофермента путем присоединения кофактора. D. Scherr и соавт. (1973) исследовали спектральные свойства двойных комплексов, образующихся при взаимодействии аналогов или фрагментов NADH с ЛДГ из сердца свиньи. Комплексообразование вызывало спектральные изменения в области 280 нм, что указывает на участие в этом процессе

ароматических аминокислот. Авторы постулировали гидрофобный характер взаимодействия адениновой части коэнзима с апо-белком.

Таким образом, суммарный регистрируемый эффект изменения каталитической активности ЛДГ при ее УФ-облучении будет зависеть от соотношения процессов сенсибилизации и протекторного эффекта NADH. Защитное действие кофермента ($Y = 13,8$ и 50%) может быть обусловлено реализацией следующих возможных процессов:

- 1) формированием более фоторезистентной конформации ЛДГ в комплексе с NADH по сравнению с апоферментом;
- 2) миграцией энергии с возбужденных аминокислотных остатков белка (в частности, триптофана) на кофермент;
- 3) акцептированием АФК (1O_2 и O_2^-);
- 4) экранирующим эффектом NADH в области длин волн $240-280$ нм.

Фотосенсибилизирующий эффект NADH по отношению к ЛДГ, по-видимому, объясняется образованием при УФ-облучении белка сольватированного электрона, акцептируемого NAD^+ , в результате чего в присутствии O_2 возможен циклический процесс перехода $NAD^+ \rightarrow NAD^{\cdot-}$ с генерированием O_2^- и других активных интермедиатов ($NAD^{\cdot-}$, H_2O_2). Кроме того, вследствие конформационных переходов протомеров ЛДГ при фотоокислении NADH могут формироваться субъединицы, занятые одновременно восстановленной и окисленной формой кофактора, что существенно изменяет характер УФ-превращений, индуцируемых в системе фермент — кофермент.

Изучение роли АФК в процессах фотомодификации белка существенно дополняют исследования фотосенсибилизированного метиленовым голубым (МГ) фотоокисления изофермента M_4 ЛДГ. Механизм действия красителя связан с генерацией 1O_2 или непосредственным взаимодействием возбужденной молекулы МГ с молекулой белка. Преобладание в системе тех или иных процессов зависит от соотношения концентраций биополимера и красителя в облучаемой системе.

Из анализа данных, представленных на рис. 58, а, следует, что облучение красным светом изофермента M_4 (10^{-8} моль/л) в течение 15 мин с МГ (10^{-7} моль/л) не вызывает статистически достоверных изменений функциональных свойств ЛДГ по сравнению с уровнем активности белка, облученного в отсутствие красителя.

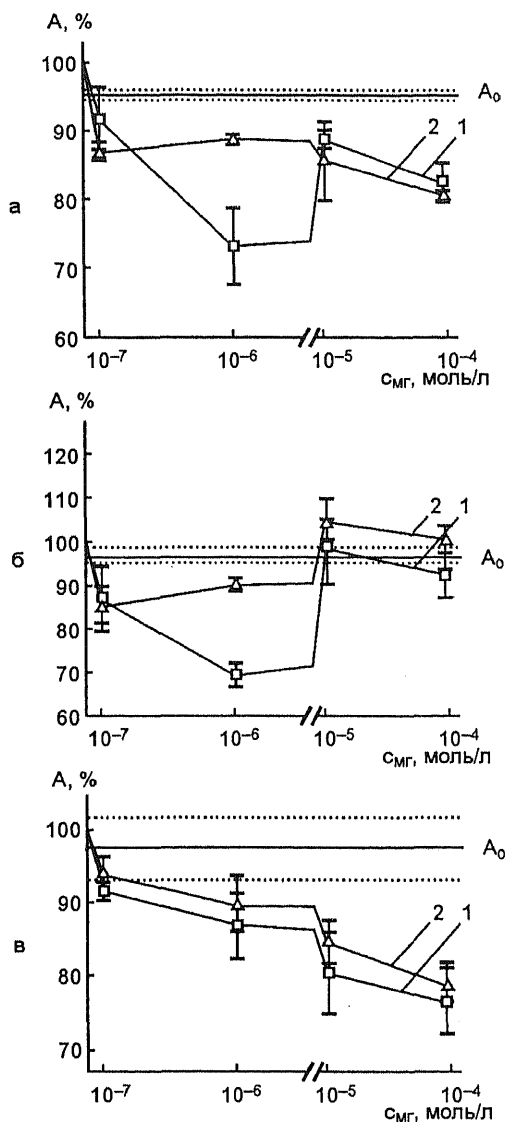


Рис. 58. Зависимость ферментативной активности ЛДГ (M_4), облученной красным светом в присутствии азида натрия ($3,2 \cdot 10^{-3}$ моль/л), от концентрации метиленового голубого: а — концентрация фермента — 10^{-8} моль/л; б — 10^{-6} моль/л; в — 10^{-7} моль/л; A_0 — активность фермента, облученного в течение 15 мин красным светом без модификаторов; 1 — ЛДГ; 2 — ЛДГ + NaN_3 .

Добавление МГ в концентрациях 10^{-6} , 10^{-5} и 10^{-4} моль/л сопровождалось эффектом сенсibilизации: активность ЛДГ снижалась на $26,7 \pm 6,0$; $11,0 \pm 1,8$ и $17,4 \pm 2,6\%$ соответственно. В присутствии NaN_3 остаточная активность фермента после его облучения с МГ (10^{-6} моль/л) составляет $87,8 \pm 3,6\%$, что свидетельствует об участии $^1\text{O}_2$ в процессе фотоинактивации ЛДГ (10^{-8} моль/л).

При использовании растворов фермента (10^{-6} моль/л) максимальный сенсibilизирующий эффект МГ обнаруживается при его концентрации 10^{-6} моль/л и составляет $30,0 \pm 4,0\%$, а остаточная активность белка, облученного в присутствии азиды натрия, равна $90,3 \pm 2,4\%$ (рис. 58, б). Аналогичные результаты были получены при исследовании фотосенсibilизированного окисления сердечной изоформы ЛДГ с участием МГ (10^{-6} моль/л).

Для ЛДГ (10^{-7} моль/л) в присутствии МГ характер изменения функциональных свойств ЛДГ от концентрации красителя при облучении их смеси оказался иным: активность фермента убывает с ростом концентрации МГ, а степень инактивации достигает максимальной величины ($23,2 \pm 4,5\%$) при концентрации сенсibilизатора 10^{-4} моль/л (рис. 58, в). При добавлении в систему азиды натрия значения исследуемого параметра не отличались от таковых для ЛДГ, фотомодифицированной в свободном состоянии.

Взаимодействие фермента с синглетным кислородом может осуществляться при относительно высоких концентрациях белка, так как $^1\text{O}_2$ характеризуется малым временем жизни. Этим, вероятно, объясняется отсутствие протекторного действия NaN_3 для низких концентраций фермента. При определенных концентрациях МГ (10^{-5} и 10^{-4} моль/л) возможно тушение его триплетного состояния своими же молекулами или взаимодействие их с $^1\text{O}_2$; этот поражающий агент не достигает активного центра белка. Кроме того, фотоинактивация ЛДГ может быть связана с комплексированием молекул красителя с поверхностными участками белковой глобулы, что благоприятствует протеканию реакций по типу I, т.е. обусловлена непосредственным химическим взаимодействием триплетных состояний сенсibilизатора с аминокислотными остатками фермента.

Суммируя результаты исследования УФ-индуцированных изменений структурно-функционального состояния изоферментов ЛДГ в условиях их различного микроокружения, можно заключить, что основной тип УФ-модификации каталитической активности изоформ ЛДГ (мышечного и сердечного типов) — фото-

инактивация ее молекул. На основании определения величин константы скорости инактивации и времени полупревращения изоферментов ЛДГ показано, что сердечная форма фермента (H_d) более фотостабильна по сравнению с мышечной (M_d). Использование широкого спектра экзогенных соединений (азида натрия, β -каротина, D-маннита, гистидина, серотонина, NADH), способных акцептировать АФК и проявлять в определенных концентрациях фотопротекторное действие по отношению к молекулам ЛДГ, позволило выявить существенную роль синглетного молекулярного кислорода в процессе фотоинактивации ЛДГ. При исследовании сенсibilизированного МГ фотоокисления изоформ

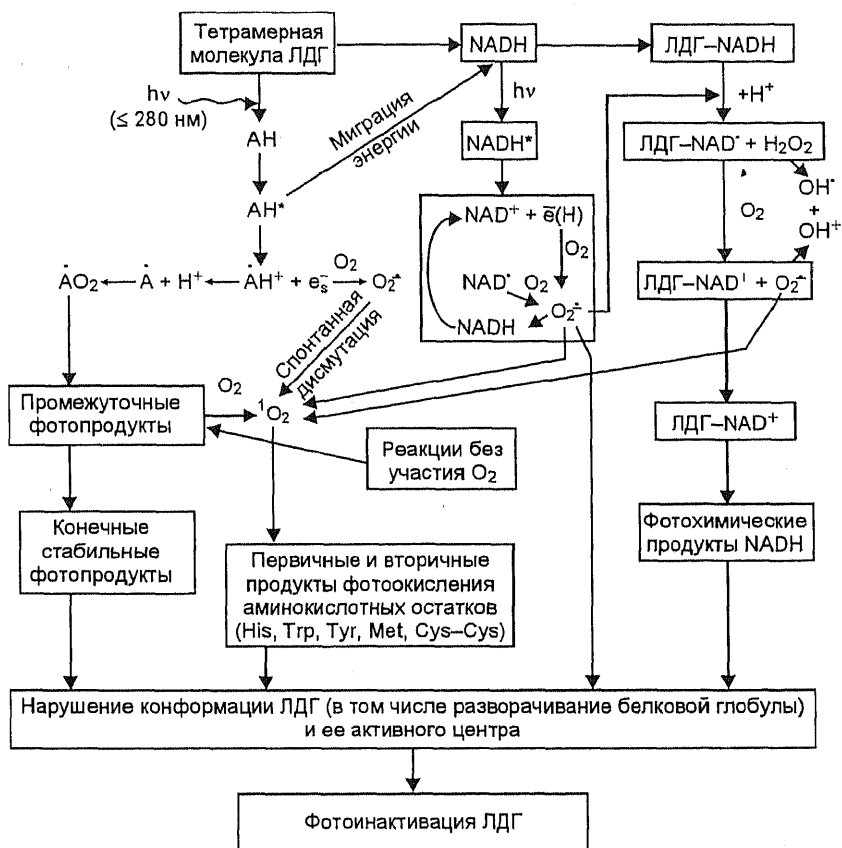


Рис. 59. Схема возможных физико-химических процессов, приводящих к фотоинаktivации молекулы лактатдегидрогеназы

фермента показана возможность окисления ЛДГ (M_4) синглетным кислородом при его экзогенной генерации.

На рис. 59 представлена схема возможных процессов, способных приводить к фотоинаktivации ЛДГ.

Результаты проведенных исследований углубляют современные представления об особенностях фотохимических превращений и функциональных нарушений отдельных изоферментов ЛДГ, индуцированных воздействием УФ-излучения. Их необходимо учитывать при изучении первичных и начальных процессов УФ-изменений сложных белков с доменной структурой. Кинетические исследования фотоокисления ЛДГ в присутствии протекторов, акцептирующих активные промежуточные продукты фотопревращений белка, позволят оценить реальный вклад каждой элементарной стадии (реакции) в сложный процесс УФ-модификации субъединичной молекулы этого фермента.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие компоненты биомембран являются акцепторами УФ-излучения?
2. Что понимают под термином "пероксидное фотоокисление липидов" мембран?
3. Каковы механизмы протекания процесса пероксидного фотоокисления липидов мембран?
4. Чем обусловлены изменения структурно-функционального состояния простых и сложных белков под влиянием УФ-излучения?
5. В чем заключаются особенности фотохимических превращений мембраносвязанных белков по сравнению со свободными?
6. Что представляет собой эффект фотохимической аллопии? Каковы условия проявления и исчезновения феномена фотохимической аллопии?
7. Что называют фотосенсибилизаторами?
8. Каковы механизмы протекания фотосенсибилизированных реакций?
9. В чем состоит роль синглетного молекулярного кислорода в реализации фотосенсибилизированных процессов?
10. Охарактеризуйте методы выявления и оценки роли синглетного кислорода в различных фотосенсибилизированных и темновых реакциях.
11. Что называют акцепторами и тушителями синглетного молекулярного кислорода? Как оценивают способность этих соединений взаимодействовать с 1O_2 ?
12. Какие биологические молекулы являются наиболее эффективными тушителями синглетного кислорода, а какие — малоэффективными?

13. В чем заключаются различия химического и физического механизмов тушения $^1\text{O}_2$ биомакромолекулами?

14. Каковы “последствия” фотосенсибилизированного повреждения молекулярных компонентов биомембран?

15. Опишите последовательность реакций, индуцированных воздействием УФ-света на отдельные мембранные компоненты и приводящих к нарушениям структурно-функционального состояния биомембран.

16. Какое теоретическое и практическое значение для медицины имеют исследования, направленные на изучение закономерностей фотохимических превращений биополимеров, их надмолекулярных комплексов и биомембран?

Глава 5

ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ МЕТОДОВ ИЗУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

5.1. КРАТКИЙ ОБЗОР ГРУПП МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОМЕМБРАН

Методы исследования биологических мембран весьма разнообразны и условно объединены в 5 групп: биохимические, физиологические, иммунологические, генетические, биофизические.

Биохимические методы позволяют разделять, выделять и анализировать в чистом виде липидные и белковые компоненты, изучать их физико-химические свойства в свободном состоянии и в составе надмолекулярных комплексов в условиях воздействия различных внешних факторов (температуры, концентрации водородных ионов и др.), исследовать их время «жизни», пути биосинтеза и распада этих компонентов. К ним относят методы выделения (недеструктивные и включающие разрушение клеток); разделения субклеточных фрагментов (хроматография, электрофорез, центрифугирование, иммуноаффинные методы); идентификации и оценки чистоты субклеточных фракций; выделения органелл и мембранных систем; экстракции липидов и разделения их по классам; количественного определения фосфолипидов; исследования трансмембранного распределения липидов; солюбилизации мембранных белков, их реконструкции и определения функциональной активности реконструированных мембран, выделения и модификации мембранных белков.

Физиологические методы используют для изучения функционирования естественных и искусственных мембран. Они позволяют исследовать проницаемость мембран, процессы возбуждения, торможения, проведения нервного импульса, распределения и выведения ионов и молекул из клеток и тканей, изменения физиологических функций клеток.

Иммунологические методы широко используются для идентификации мембранных компонентов, их локализации, оценки количества, выделения. Это методы получения поликлональных и моноклональных антител к компонентам мембран, иммуноблоттинг (электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия с перенесением разделенных белков на нитроцеллюлозные фильтры для последующего выявления с по-

мощью антител), иммунологическая очистка субклеточных фракций, иммунологическое выделение мембранных компонентов, использование антител для отбора комплементарных ДНК, кодирующих мембранные белки.

Генетические методы основаны на использовании мутантов, дефектных по синтезу определенных мембранных белков. Они позволяют исследовать функции мембранных белков, их роль в функционировании мембран, проблемы самоорганизации мембран.

Биофизические методы позволяют изучать динамическую организацию биомембран, получить представления об упаковке и движении липидных молекул в природных и модельных мембранах, их взаимодействии друг с другом и молекулами белков, исследовать фазовые переходы и другие процессы. К ним относятся дифракционные методы (рентгеновская дифракция, дифракция нейтронов), резонансные методы, метод электронной микроскопии, оптические методы (круговой дихроизм, дисперсия оптического вращения, абсорбционная спектроскопия, люминесценция, метод флуоресцентных зондов), метод дифференциальной сканирующей микрокалориметрии, метод моделирования и получения искусственных мембран и др.

Дифракционные методы основаны на взаимодействии электромагнитного излучения или частиц с длиной волны, соизмеримой с межатомным расстоянием, и компонентов мембраны. Их используют для определения геометрических параметров структуры: типа липидной мезофазы и ее периодичности, толщины бислоя, среднего расстояния между углеводородными цепями. К этим методам относятся рентгеновская дифракция (рентгеноструктурный анализ) и дифракция нейтронов.

В основе рентгеноструктурного анализа лежит взаимодействие рентгеновского излучения с электронами вещества, в результате которого возникает дифракция рентгеновских лучей с длиной волны $\sim 0,1$ нм. Последние рассеиваются на электронных оболочках атомов. Интерференция волн, рассеянных веществом, приводит к возникновению дифракционной картины, что позволяет зарегистрировать рентгенограмму. При рассеянии на кристалле можно рассматривать дифракцию как отражение рентгеновских лучей плоскостями кристаллической решетки. Дифракция наблюдается, если рассеянные волны находятся в фазе, т.е. разность хода лучей равна целому числу волн n .

Условие дифракции (отражения) описывает формула Брэгга—Вульфа:

$$n\lambda = 2 d \sin \Theta,$$

где λ — длина волны; d — расстояние между кристаллическими плоскостями; Θ — угол между направлением падающего луча и кристаллической плоскостью.

На основании дифракционной картины, получаемой для рентгеновских лучей с известной длиной волны, определяют параметр d . Дифракционная картина зависит от длины волны рентгеновских лучей и строения объекта. Анализ дифракционных максимумов позволяет установить распределение электронной плотности в кристалле. Рентгеноструктурный анализ дает информацию о расположении атомов в молекулах и кристаллах.

Для построения профилей электронной плотности, а также для изучения ориентации и характера упаковки углеводородных цепей используют мультислои липидов или смесей липидов и белков, ориентированные на твердой подложке. Их получают путем постепенного нанесения липидов при многократном прохождении стеклянной пластины сквозь монослой липида на границе раздела вода — воздух или путем спонтанного образования мультислоев, параллельных подложке, при испарении органического растворителя из капли липидного раствора.

Метод рентгеновской дифракции позволяет установить наличие бислойной структуры в природных и модельных мембранах и определить параметры бислоя. На основании анализа дифракционной картины можно исследовать состояние углеводородных цепей мембранных липидов и зарегистрировать фазовый переход из гелеобразного в жидкокристаллическое состояние. Однако из-за высокой лабильности и сравнительно малой упорядоченности структуры биомембран метод рентгеноструктурного анализа не позволяет изучить локализацию мембранных белков. Лишь в мембранах, содержащих упорядоченные белковые комплексы, удастся выявить наличие и ориентацию α -спиральных участков интегральных белков.

С помощью метода дифракции нейтронов, дополняющего рентгеноструктурный анализ, определяют расположение молекул и их частей в бислое путем изотопного замещения водорода на дейтерий. В отличие от рентгеновского излучения, нейтроны практически одинаково эффективно рассеиваются легки-

ми и тяжелыми атомами. Взаимодействие с некоторыми ядрами, имеющими соответствующие резонансные уровни энергии, приводит к изменению знака амплитуды рассеяния. Амплитуда когерентного рассеяния ядром (b) связана с эффективным сечением (σ) соотношением: $b = \sqrt{\sigma/4\pi}$. Различие в рассеянии нейтронов атомами водорода и дейтерия позволяет широко использовать эффекты изотопного замещения для изучения биомембран.

Резонансные методы анализа веществ подразделяют на метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР).

Метод ЯМР основан на резонансном поглощении в сильном внешнем магнитном поле энергии электромагнитного радиочастотного поля системой атомных ядер, обладающих магнитным моментом. Он позволяет получать сведения о подвижности молекул липидов биомембран, об упаковке фосфолипидных молекул в бислое, используется для регистрации изменений значения pH в частицах малого размера (искусственные мембраны, митохондрии), изучать процессы латеральной диффузии липидов и трансбислойного движения ("флип-флоп"-переходы) молекул.

Положение спектральной линии ЯМР относительно некоторой эталонной линии называют химическим сдвигом. Химический сдвиг (δ) — это отношение сдвига частоты поля ($\Delta\omega$) к эталонному значению (ω_0), умноженное на 10^6 :

$$\delta = (\Delta\omega/\omega_0) \cdot 10^6 = \Delta H/H_0 \cdot 10^6,$$

где H_0 — напряженность постоянного магнитного поля.

Величина δ для алифатических протонов варьирует от $-0,5$ до $-2,0$, ароматических протонов — от $-6,0$ до $-8,5$. В качестве эталона для протонного резонанса органических соединений используют тетраметилсилан $(CH_3)_4Si$, а для водных растворов биополимеров — 2,2-диметил-2-силанпентан-5-сульфоновую кислоту (ДСС). При высоком разрешении наблюдается сверхтонкая (мультиплетная) структура линий ЯМР, возникающая вследствие магнитного взаимодействия между ядрами, передаваемого через электроны связи (непрямое спин-спиновое взаимодействие).

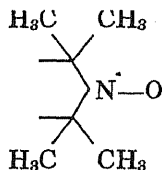
К недостаткам метода ЯМР следует отнести низкую чувствительность (концентрация образца должна быть не менее 10^{-3} моль/л), а также малую эффективность в изучении крупных молекул, т.е. мембранных белков.

Метод ЭПР — это резонансное поглощение энергии электромагнитных колебаний в сантиметровом или миллиметровом диапазоне длин волн веществами, содержащими парамагнитные частицы (молекулы, атомы, ионы, свободные радикалы, слабо связанные с атомом электроны). Условие резонанса, при соблюдении которого образец поглощает электромагнитную энергию, описывают уравнением

$$h\nu = \Delta E = g\beta H,$$

где h — постоянная Планка; ν — частота переменного электромагнитного поля; ΔE — разность энергий между магнитными подуровнями, которые образуются в результате расщепления уровней энергии парамагнитной частицы в постоянном магнитном поле H ; g — фактор расщепления (отношение магнитного момента парамагнитной частицы к ее механическому моменту (спину)); β — магнетон Бора.

Метод ЭПР основан на введении в липидный бислой парамагнитных меток и зондов. Основу спиновых меток и зондов составляет стабильный свободный иминоксильный (нитроксильный) радикал с неспаренным электроном, локализованным преимущественно у атома азота:



Если производное такого радикала присоединяется к белку или липиду ковалентной связью, то такое производное называют спиновой меткой, а если с помощью электростатических сил и гидрофобных взаимодействий — то спиновым зондом.

Выбор спинового зонда или метки определяется задачами исследования. Так, для изучения характера движения липидных молекул используют липофильные спин-меченные жирные кислоты, глико- и фосфолипиды. Последние применяют также для исследования латерального фазового разделения липидов и липид-белковых взаимодействий.

Некоторые амфифильные зонды, в частности 2,2,6,6-тетрамилпиперидин-N-оксил (ТЕМРО), растворяются частично в углеводородной зоне мембраны, а частично — в ее полярной области. Поэтому их спектры зависят от полярности окружения. Рас-

пределение такого зонда в мембране определяется фазовым состоянием липидов и “чувствительно” к их фазовым переходам.

Гидрофильные спиновые зонды, представляющие собой модификацию зонда ТЕМРО и изменяющие свой заряд в зависимости от величины рН, способны связываться с различными участками полярных групп мембраны за счет электростатических взаимодействий. Их используют для исследования поверхностного потенциала и плотности заряда мембранной поверхности.

Более предпочтительным для изучения биомембран является одновременное применение нескольких зондов, по-разному взаимодействующих с компонентами мембран, что позволяет исследовать цитоплазматическую и наружную поверхности мембран клеток и клеточных органелл.

Таким образом, метод ЭПР применяют для изучения фазовых переходов в липидном бислое, микровязкости мембран, подвижности углеводородных цепей, латеральной диффузии и “флип-флоп”-переходов. Недостаток этого метода заключается в том, что введение зонда изменяет структуру бислоя и свойства мембраны. Метод ЭПР более чувствителен по сравнению с методом ЯМР, так как магнитный момент электрона в 1000 раз выше, чем ядра.

С помощью *метода электронной микроскопии* (разрешающая способность электронного микроскопа находится в диапазоне 2—4 нм и превышает таковую для оптического микроскопа более чем в 500 раз) исследуют морфологию внутренних поверхностей двух монослоев, распределение фаз в мембране, трехмерную молекулярную структуру мембранных белков, форму и размеры солиобилизованных мембранных белков. Однако необходимость проведения обезвоживания, фиксации и контрастирования объекта солями тяжелых металлов приводит к существенной модификации структурного состояния компонентов мембран.

Разновидность метода электронной микроскопии — “замораживание—скалывание”. Его применяют для изучения характера связывания белков с мембранами. Для этого образец, не требующий химической фиксации, замораживают в жидком азоте, а затем раскалывают в плоскости наименьшего сопротивления холодным ножом в вакууме. Плоскость наименьшего сопротивления проходит между двумя слоями липидной фазы мембраны. Далее поверхность образца покрывается платиной и углеродом, его растворяют и отпечаток (реплику) рассматривают в элект-

ронный микроскоп. Если лед возгоняют с поверхности образца, то модификацию метода называют “замораживание—травление”.

Оптические методы позволяют получить информацию о механизме фотосинтеза, электронном транспорте, транспорте кислорода в тканях, транспорте ионов, взаимодействии веществ различной природы с мембранами, белок-липидных взаимодействиях и других процессах. Они основаны на присутствии в изучаемой системе эндогенных или экзогенных (вносимых в систему экспериментатором) хромофорных групп. К эндогенным хромофорам относятся порфирины, флавины, каротиноиды, пиридин-нуклеотиды, цитохромы, гемоглобин, миоглобин, которые поглощают свет в видимой области спектра. Акридины, нафталин-сульфонаты, цианины являются экзогенными хромофорами. К оптическим методам относят абсорбционную спектрофотометрию, люминесценцию, метод флуоресцентных зондов, а также круговой дихроизм, дисперсию оптического вращения. Последние наряду с ИК-спектроскопией и спектроскопией комбинационного рассеяния используются для определения содержания различных элементов вторичной структуры молекулы белка, позволяя изучать ее конформационные переходы.

Люминесценция наблюдается в результате поглощения веществом энергии возбуждения, перехода его частиц из основного в возбужденное электронное состояние и обратно. Она представляет собой свечение атомов, ионов, молекул и их комплексов, возникающее в результате электронного перехода из возбужденного состояния в основное.

Все известные виды люминесценции подразделяют на два больших класса: флуоресценцию и фосфоресценцию. Под флуоресценцией понимают свечение, мгновенно (10^{-9} с) затухающее после прекращения возбуждения. Квант флуоресценции испускается при переходе из синглетного возбужденного состояния S_1 (с его нижнего колебательного подуровня) в синглетное основное состояние S_0 : $S_1^* \rightarrow S_0 + h\nu_{\text{фл}}$. Фосфоресценция — свечение, продолжающееся в течение длительного промежутка времени ($>10^{-6}$ с) после прекращения возбуждения. Квант фосфоресценции высвечивается при переходе (с обращением спина) электрона из триплетного возбужденного состояния T_1 в основное состояние: $T_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{\text{фос}}$.

Есть и другие виды классификации люминесценции: по типу возбуждения свечения и кинетике процесса люминесценции. Так,

в случае возбуждения вещества световыми квантами возникающее при этом свечение называется фотолюминесценцией.

В зависимости от кинетических характеристик свечения выделяют резонансную, спонтанную, вынужденную и рекомбинационную люминесценцию.

Резонансная флуоресценция — основа процесса атомной люминесценции — представляет собой излучение фотонов той же энергии, что и у поглощенных фотонов возбуждающего света; наблюдается в газах и кристаллах.

При спонтанной люминесценции после возбуждения молекула сначала переходит на высокий возбужденный электронный уровень S_2 , а затем путем безызлучательного перехода — на более низкий возбужденный уровень S_1 . Квант люминесценции высвечивается при переходе $S_1 \rightarrow S_0$, поэтому его величина оказывается меньше, чем у поглощенного кванта. Спонтанная люминесценция наблюдается у паров, растворов сложных молекул, молекулярных кристаллов.

Вынужденная люминесценция характерна для сложных органических молекул, находящихся при низкой температуре или в жестких средах. В этом случае при возбуждении молекула переходит из состояния S_0 в возбужденные состояния S_2^* и S_1^* , затем безызлучательным путем — в Т (триплетное), переход из которого в S_0 запрещен правилами отбора. За счет внутренней колебательной энергии или сообщенной извне тепловой энергии осуществляется переход в основное состояние с испусканием кванта люминесценции.

Спонтанный и вынужденный типы излучения наиболее характерны для молекулярных систем и поэтому их называют молекулярной люминесценцией.

Рекомбинационная люминесценция наблюдается у газов и сложных неорганических кристаллов в случае рекомбинации радикалов или ионов с образованием их возбужденных молекул.

Спектром люминесценции вещества называют зависимость интенсивности люминесценции от длины волны (частоты) измеряемого света. Спектр возбуждения люминесценции — это зависимость интенсивности люминесценции от длины волны возбуждающего света.

Теоретически спектры возбуждения люминесценции молекул должны быть идентичны по форме их спектрам поглощения и не зависеть от длины волны измерения флуоресценции. Однако

чаще всего на практике эти спектры отличаются вследствие различий физико-химических свойств молекул в основном и возбужденном состояниях. Например, в возбужденном состоянии могут изменяться геометрические параметры, межатомные расстояния и, следовательно, дипольные моменты молекул, степень диссоциации последних. Для устранения кажущихся различий между спектрами поглощения и возбуждения необходимо соблюдение следующих условий: а) одинаковой интенсивности возбуждающего света во всем диапазоне частот; б) отсутствие вторичного поглощения исследуемого излучения.

Форма спектра люминесценции (правило Каши) и квантовый выход (закон Вавилова) не зависят от длины волны возбуждающего света. Это обусловлено тем, что при поглощении больших квантов возбуждающего света происходит переход молекул из основного состояния S_0 в возбужденные S_2^* , S_3^* , однако излучательный переход осуществляется только из состояния S_1^* (люминесценция), а переходы $S_2^* \rightarrow S_1^*$, $S_3^* \rightarrow S_1^*$ происходят безызлучательно.

Согласно правилу Стокса частоты возбуждающего света всегда больше или равны частотам люминесценции: $\nu_{\text{возб}} > \nu_{\text{люм}}$, т. е. одна часть поглощаемой молекулой энергии идет на возбуждение люминесценции, а другая расходуется на увеличение ее колебательной энергии и развитие безызлучательных переходов. Однако строгое выполнение правила Стокса наблюдается у атомов и простых молекул в газовой фазе. Спектры поглощения и люминесценции молекул могут перекрываться, т. е. значения частот переходов между электронными уровнями при поглощении могут быть меньше, чем при испускании. Следовательно, наблюдается нарушение правила Стокса. Часть спектра люминесценции, где выполняется правило Стокса, называется стоксовой областью, а где оно нарушается — антистоксовой. Поэтому это правило характеризует одиночный акт поглощения и испускания света молекулой.

В соответствии с законом Стокса—Ломмеля спектр излучения и его максимум всегда сдвинуты по сравнению со спектром поглощения и его максимумом в сторону более длинных волн:

$$h\nu_{\text{люм макс}} < h\nu_{\text{погл макс}}$$

Этот закон носит статистический характер и описывает поглощательные и излучательные свойства совокупности молекул

исследуемого образца. Поэтому образование антистоксовой области спектра люминесценции не противоречит закону сохранения энергии: колебательная энергия молекул частично преобразуется в энергию их люминесценции, что удовлетворяет условию: $h\nu_{\text{люм}} > h\nu_{\text{погл}}$.

Закон Стокса—Ломмеля является качественным выражением правила зеркальной симметрии спектров поглощения и люминесценции Левшина, которое гласит: спектры поглощения и люминесценции зеркально симметричны относительно прямой, проходящей перпендикулярно к оси частот (длин волн) через точку пересечения спектров.

Эффективность процесса превращения энергии возбуждающего света в энергию люминесценции характеризуется квантовым выходом люминесценции. Это отношение числа высвеченных квантов люминесценции к числу поглощенных квантов возбуждающего света.

Молекулы люминесцирующих веществ оптически анизотропны, поэтому люминесцентное излучение каждой молекулы частично поляризовано. Если анизотропные молекулы ориентированы хаотично, то вещество в целом становится изотропным, а его люминесценция — неполяризованной. При возбуждении вещества линейно-поляризованным светом его поглощение осуществляется молекулами, у которых поглощающий осциллятор параллелен электрическому вектору падающего света. Поэтому поглощение полностью отсутствует у молекул, поглощающий осциллятор которых перпендикулярен электрическому вектору возбуждающего света. В этом случае измеряют поляризационные спектры флуоресценции — зависимость степени поляризации флуоресценции объекта от длины волны возбуждающего света (поляризационные спектры по поглощению) или длины волны регистрации при фиксированной длине волны возбуждения (поляризационные спектры по испусканию).

Для количественной оценки поляризованной люминесценции используют степень поляризации (P) люминесценции:

$$P = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp}),$$

где $I_{\parallel}$ и $I_{\perp}$ — соответственно параллельная и перпендикулярная электрическому вектору возбуждающего света составляющие поляризованной люминесценции.

Степень анизотропии (r) излучения определяется по формуле:

$$r = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp}).$$

Использование этой характеристики для описания процессов поляризованной люминесценции более корректно, так как учитывает третью составляющую, перпендикулярную электрическому вектору возбуждающего света (т.е. в знаменателе уравнения для определения r находится величина, пропорциональная суммарному значению интенсивности).

Связь между величинами P и r отражает следующее уравнение:

$$r = 2P / (3 - P).$$

Анизотропия оптической среды проявляется как при испускании, так и при поглощении света. Для характеристики анизотропии поглощения света используют степень дихроизма d :

$$d = (D_{\parallel} - D_{\perp}) / (D_{\parallel} + D_{\perp}),$$

где $D_{\parallel}$ и $D_{\perp}$ — оптические плотности, измеренные при облучении исследуемого образца линейно-поляризованным светом с колебаниями электрического вектора, параллельными и перпендикулярными главной оптической оси системы.

Перреном и Яблонским установлена связь между степенью поляризации (P) флуоресценции и вязкостью среды (η):

$$1/P - 1/3 = (1/P_0 - 1/3) \cdot (\tau RT / V\eta + 1),$$

где P_0 — предельное значение поляризации при $T/\eta \rightarrow 0$; R — универсальная газовая постоянная; T — абсолютная температура; V — объем моля флуоресцирующих молекул; τ — время жизни возбужденного состояния. Этой формулой пользуются для расчета значений τ .

Варьируя угол направления поляризации флуоресценции, устанавливают направление и степень ориентации молекул в анализируемом образце. Исследование поляризации флуоресценции позволяет изучать миграцию энергии в биосистемах, определять размеры биомакромолекул и время жизни их возбужденного состояния. Поляризацию флуоресценции определяют для того, чтобы судить о микровязкости мембраны.

Так, микровязкость мембраны изучают путем измерения P для флуоресцентного зонда, введенного в исследуемую систему. Метод флуоресцентных зондов подробно рассмотрен в разделе 6.4.

В целом флуоресцентный метод анализа — один из безынерционных, высокочувствительных методов исследования, применяемых для качественного и количественного анализа смесей веществ, изучения механизма фотофизических и фотохимических процессов в биосистемах и конформационных свойств биомолекул.

Инфракрасная (ИК) спектроскопия занимается анализом молекулярных спектров, так как в ИК-области спектра ($10\,000\text{—}400\text{ см}^{-1}$) расположено большинство колебательных и вращательных спектров молекул. В ИК-диапазоне поглощается свет тех частот, которые равны частотам колебаний атомов в молекуле. ИК-спектр поглощения, возникающий в результате поглощения ИК-излучения при прохождении его через вещество, состоит из большого числа полос, причем часть полос поглощения обусловлена колебаниями отдельных атомных группировок, более или менее сохраняющих свои свойства в разных молекулах. Характеристики ИК-спектра (число полос поглощения, их положение, определяемое частотой ν или длиной волны λ , ширина и форма, интенсивность поглощения в максимумах) определяются структурой и химическим составом поглощающего вещества и зависят от его структурного состояния, а также температуры, давления и других факторов. Метод ИК-спектроскопии позволяет определять структуру молекул, их химический состав, моменты инерции, величины сил, действующих между атомами в молекуле, проводить качественный и количественный анализ смесей различных веществ.

Сущность одного из видов метода ИК-спектроскопии — ИК-дихроизма — заключается в измерении разности поглощения света, поляризованного вдоль оси ориентации и перпендикулярно этой оси ориентации молекулы. С помощью измерения ИК-дихроизма можно установить, как направлены важнейшие группы белка ($>C=O$ и $-NH$) по отношению к оси его макромолекулы. Необходимыми для определения частотами пептидной связи белков являются следующие: 3330 см^{-1} для валентного колебания $-NH$ -группы (колебание ядер вдоль линии связи между атомами в молекуле), 1660 см^{-1} для валентного колебания $>CO$ -группы и 1550 см^{-1} для деформационного колебания (колебания, обусловленные периодическими изменениями угла между связями отдельных атомов в молекуле) NH -группы. Анализ смещения этих полос поглощения, изменения их ширины, формы, величины по-

глощения позволяет судить о состоянии вторичной структуры белков и полипептидов.

Дисперсия оптического вращения (оптической активности) — зависимость угла вращения (поворота) плоскости поляризации света (φ) или удельной оптической активности (удельного вращения $[\alpha]$) от длины волны λ оптического излучения, проходящего через среду:

$$\varphi = [\alpha] l c,$$

где l — толщина слоя активного вещества или его раствора; c — концентрация этого вещества.

Поворот плоскости поляризации в данной среде происходит либо по часовой стрелке ($\varphi > 0$), либо против часовой стрелки ($\varphi < 0$), если смотреть навстречу ходу лучей. В связи с этим вещества, проявляющие естественную оптическую активность, не вызываемую наличием внешних полей, разделяют на правовращающие (положительно вращающие — d , $\varphi > 0$) и левовращающие (отрицательно вращающие — l , $\varphi < 0$). Ж. Био (1815) установил, что в случае чистых жидкостей, растворов и паров многих органических веществ угол вращения плоскости поляризации φ тем меньше, чем больше λ ($\varphi \sim \lambda^{-2}$). Такая дисперсия оптического вращения (ДОВ) характерна для нормальной оптической плотности — вдали от длин волн λ_0 , на которых в оптически активном веществе происходит резонансное поглощение. Э. Коттон, изучавший оптическую активность для излучений с λ , близкими к λ_0 (212 нм), обнаружил аномальную оптическую активность — увеличение φ с ростом λ .

При анализе оптической активности веществ, в том числе белков и полипептидов, наиболее удобной величиной является молярное вращение $[M]_\lambda$, связанное с удельным вращением $[\alpha]_\lambda$ следующим уравнением:

$$[M]_\lambda = [\alpha]_\lambda \cdot M/100.$$

В качестве молекулярной массы M применяют среднюю массу M аминокислотного остатка из числа остатков, составляющих полипептидную цепь белковой макромолекулы. Кривые дисперсии оптического вращения и кругового дихроизма в области эффекта Коттона, где поглощение обусловлено основной полипептидной цепью, отражают вторичную структуру белковых молекул. Изучение и анализ кривых ДОВ и кругового дихроизма для таких конформаций, как α -спираль, β -структура, неупорядо-

ченная конформация, проводятся на основании результатов исследования синтетических полипептидов (полиглутаминовой кислоты или полилизина), а также по экспериментальным данным для белков, структура которых установлена методом рентгеноструктурного анализа.

Круговой дихроизм (эффект Коттона) — это различие поглощения для света правой и левой круговых поляризаций. Эффект Коттона является одним из лучших современных методов характеристики природы спиральных конформаций и оценки степени спиральности белковых молекул.

Микрокалориметрия — информативный метод исследования термодинамических характеристик вещества, в частности, температурного хода теплоемкости. Современные чувствительные микрокалориметры используют для исследования фазовых переходов (определения изменений энтальпии и энтропии этих процессов) в водно-липидных суспензиях с использованием небольших (несколько мг) количеств материала. Принцип метода дифференциальной сканирующей калориметрии состоит в измерении количества тепла, необходимого для увеличения температуры объекта на очень малую величину в пределах узкого температурного интервала при постоянном давлении.

Для изучения фазовых переходов при плавлении фосфолипидных бислоев измеряют теплоемкость C_p суспензии фосфолипидов при разных температурах в области фазового перехода. Показано, что в этой области происходит резкое возрастание значения C_p . Максимум теплоемкости на кривой зависимости C_p от температуры соответствует температуре плавления. Площадь под пиком на указанной кривой соответствует общему количеству тепла, поглощаемому при переходе из твердого состояния липидного слоя в жидкое (фазовый переход). Для чистых липидов величины изменения энтальпии и энтропии для перехода кристалл — жидкий кристалл линейно зависят от длины углеводородных цепей. В целом температура плавления понижается в ряду: холины — этаноламины — серины. Типичные зависимости избыточной удельной теплоемкости от температуры для дипальмитоилфосфатидилхолина имеют два максимума. Максимум при более высокой температуре соответствует собственно переходу при температуре T_m (температуре плавления), другой характеризует так называемый предпереход, при котором происходит трансформация одномерной ламеллярной решетки в двумерную,

образованную искаженными слоями липида и нарушенную периодическими складками.

Водные дисперсии, содержащие два или более липидных компонентов, проявляют гораздо более сложные термотропные свойства.

Метод моделирования и получения искусственных мембран основан на получении и исследовании моно- и бимолекулярных липидных слоев, везикул, липосом и протеолипосом. Существует два основных типа искусственных мембран: классические плоские и сферические мембраны различного размера. Для получения искусственных мембран используют различные фосфатиды, нейтральные глицериды, смеси липидов биологического происхождения, добавляя к ним холестерин, α -токоферол и другие минорные добавки. Потенциальная ценность искусственных мембран для исследований зависит от возможности включения в них природных белков, в особенности тех, которые обладают транспортными свойствами. Липосомы, состоящие из белков и липидов, стали получать в 60-е гг.; термин “протеолипосомы” был введен В. П. Скулачевым. В настоящее время разработан целый ряд методов приготовления различных типов липосом и протеолипосом, а также их стандартизации по размерам, структуре, гомогенности, стабильности и другим характеристикам. Липосомы используют для доставки в клетку лекарственных и химических соединений, стабилизации ферментов в инженерной энзимологии, введения в клеточные мембраны молекул зондов, модифицирующих и моделирующих их поверхность. Большой интерес для генной инженерии и медицины представляют работы по введению в клетки при помощи липосом нуклеиновых кислот и вирусов. В липосомы включают митохондриальные компоненты и изучают на таких модельных системах процессы генерации энергии в клетках. Ультратонкие искусственные мембранные структуры — полислои Ленгмюра—Бложе (ПЛБ) — применяют для получения био- и иммуносенсоров. Создаются ПЛБ с иммобилизованными ферментами и компонентами иммунологических систем. При использовании смешанных липид-белковых пленок ПЛБ получают информацию о функционировании белков и о липид-белковых взаимодействиях в мембране. Результаты изучения физических характеристик, проводимости, проницаемости и других свойств искусственных липидных мембран имеют большое зна-

чение для понимания структурно-функциональной организации нативных биологических мембран.

Необходимо отметить, что для решения определенной научной задачи применяют не один, а целый ряд методов, что позволяет скомпенсировать недостатки и ограничения каждого из них за счет достоинств других методов. Так, например, для исследования белок-липидных взаимодействий используют методы ЭПР, ЯМР, измерения флуоресценции, комбинационного рассеяния, ИК-спектрофотометрии и др.

5.2. ВЫДЕЛЕНИЕ И РАЗДЕЛЕНИЕ МЕМБРАН

Выделению мембран предшествует этап разрушения клеток и тканей. Для этого подбирают методику, позволяющую не только эффективно разрушать клетки, но и сохранять нативную структуру мембран, подлежащих выделению. При выделении большинства мембран животных клеток используют гомогенизацию в гомогенизаторах Даунса и Поттера со стеклянными стенками и тефлоновым пестиком. Для разрушения клеток применяют также вращающиеся ножевые гомогенизаторы. Предварительно свежее выделенную ткань измельчают и промывают водой. В гомогенизаторе клетки разрушаются за счет сдвиговых усилий, возникающих при продавливании суспензии через узкий зазор между тефлоновым пестиком и стеклянной стенкой. При гомогенизации следует тщательно подбирать значение pH, ионную силу и состав буферного раствора. Часто в качестве суспендирующей среды используют раствор сахарозы в концентрации 0,25 моль/л с добавлением хлорида магния, комплексообразователей (например, ЭДТА), восстановителей (дитиотреитол, β -меркаптоэтанол).

С целью облегчения последующего разрушения растительных, грибных и бактериальных клеток их сначала обрабатывают ферментами, расщепляющими компоненты клеточной стенки (лизозим, целлюлаза). Более жесткая обработка клеток предусматривает их растирание с помощью абразивных материалов (стеклянных шариков, песка, оксида алюминия), разрушение ультразвуком и путем экструзии (продавливание суспензии клеток через отверстия под давлением). Полученный гомогенат клеток процеживают и используют дальше для получения мембран.

Чаще всего для разделения мембран применяют *метод центрифугирования*. Мембранные частицы разделяют по скорости их седиментации (зональное центрифугирование) или по плавучей

плотности (изопикническое центрифугирование). Коэффициент седиментации (S) определяется по формуле:

$$S = v/w^2r = m(1 - V\rho)/f,$$

где v — скорость движения частицы; w — угловая скорость вращения ротора; r — расстояние до центра вращения; m — масса частицы; f — коэффициент трения; ρ — плотность растворителя; V — парциальный удельный объем частицы (равный увеличению объема, вызываемого прибавлением единицы массы растворимого вещества к раствору).

Величина коэффициента седиментации зависит от нескольких факторов: концентрации раствора, скорости движения частиц, заряда, формы и массы частиц. Введено понятие стандартного значения константы седиментации, определяемое в системе, имеющей вязкость и плотность воды при $+20^\circ\text{C}$ (S_{20}°).

Для выделения различных мембранных структур из гомогената, имеющих разные величины коэффициента седиментации, применяют зональное центрифугирование в градиенте плотности определенных веществ. Исследуемый раствор наносят на предварительно приготовленный в центрифужной пробирке градиент плотности и центрифугируют. Градиент создается путем последовательного наложения растворов градиентной среды уменьшающейся концентрации (плотности) в центрифужной пробирке. Субклеточные структуры разделяются на отдельные зоны в соответствии с их относительной плотностью. Для создания градиента плотности необходимо подбирать вещества в чистом состоянии, не взаимодействующие с компонентами суспензии и реагентами исследуемого раствора. Чаще всего для этого используют сахарозу, однако ее растворы с высокой концентарцией имеют большую вязкость, вследствие чего происходит дегидратация органелл или их лизис. Кроме того, серьезным недостатком этого метода является проницаемость многих органелл для сахарозы, что вызывает их осмотическое разрушение и изменение эффективной плотности. Поэтому в настоящее время для создания градиента плотности предпочитают применять другие среды: фиколл, перколл и др. (табл. 16).

Основные компоненты клетки осаждают в такой последовательности: целые клетки и их фрагменты, ядра, митохондрии, лизосомы, микротельца, микросомы (фрагменты эндоплазматической сети и плазматических мембран), отдельные типы мембранных структур.

Таблица 16

Характеристика некоторых градиентных сред для выделения мембранных компонентов методом центрифугирования

Среда	Структура	Кон- цент- рация, %	Плот- ность, г/мл	Вяз- кость, сП	Осмоляль- ность, мОсм/кг H ₂ O	Преимущества или недостатки
Сахароза	Дисахарид C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	20	1,06	30	700	Гипертонические раство- ры способны вызывать ли- зис органелл
Фиколл	Гидро- фильный полимер (400 кДа) сахарозы	30	1,10	49	130	Низкое осмотическое да- вление позволяет создавать растворы, изотоничные во всем диапазоне концент- раций благодаря допол- нительному включению сахарозы или солей. Вы- сокая вязкость растворов и нелинейная зависимость вязкости и осмолярности от концентрации
Перколл	Коллоид- ная суспен- зия сили- кагеля, частицы которого покрыты поливи- нилпирро- лидоном	26	1,13	10	10	Растворы имеют низкую вязкость и осмолярность, не проникают через мемб- рану. Большой размер частиц при умеренных скоростях оборота спо- собствует формированию градиента плотности и быстрому разделению. Среда разделения может быть изотоничной благодаря включению сахарозы или солей

Необходимо отметить, что получаемые при разрушении кле-
ток мембранные фрагменты способны самопроизвольно образо-
вывать замкнутые пузырьки — везикулы. К ним относят мик-
росомы, субмитохондриальные частицы из внутренней митохон-
дриальной мембраны, синаптосомы, образующиеся при отрыве
нервных окончаний в области синаптических контактов. Ско-
рость оседания таких частиц при центрифугировании определя-
ется их размерами, зависящими от метода разрушения клеток и
состава среды. Для сохранения замкнутости мембранных орга-
нелл используют среду, изотоничную их внутреннему содер-
жимому (сорбитол, маннитол, сахарозу).

Следует подчеркнуть, что препаративные типы центрифуг при-
меняют для получения и очистки клеточных органелл или макро-
молекул, т. е. чистых фракций (препаратов). Аналитические цент-

рифуги позволяют анализировать распределение веществ в пробирке в течение всего опыта. Поэтому они снабжены оптической системой (плизированной, интерференционной, абсорбционной).

Для выделения мембран из клеточных гомогенатов используют и другие методы: хроматографию, электрофорез, адсорбцию.

Распределительная хроматография основана на различиях в распределении разделяемых веществ между двумя фазами: подвижной (растворитель) и неподвижной (сорбент). Ее разновидностями являются хроматография на бумаге, тонкослойная, колоночная, газожидкостная. Большой разрешающей способностью характеризуется тонкослойная хроматография: она позволяет обнаружить 1 нмоль вещества. Слой сорбента (толщина до 0,5 мм) готовится из силикагеля, оксида алюминия, целлюлозы. При этом обеспечивается низкое отношение массы растворенного вещества к массе сорбента (до $1/10^8$) и большое отношение поверхности к объему. Разрешающая способность метода колоночной хроматографии на несколько порядков ниже, чем для тонкослойной, так как отношение массы растворенных веществ к массе сорбента равно 1/50.

Адсорбционная хроматография основывается на различной способности молекул смеси адсорбироваться на поверхности носителя (силикагель, окись алюминия, активированный уголь) при пропускании через него подвижной фазы. Принцип метода ионообменной хроматографии — разновидности адсорбционной хроматографии — заключается в способности ионообменника (отрицательно заряженного катионита или положительно заряженного анионита) обратимо адсорбировать заряженные молекулы при определенных значениях pH. Мембранные белки и углеводы разделяют на ионообменниках на основе целлюлозы, декстрана, полиакриламида.

Гельпроникающая хроматография успешно применяется для разделения и очистки мембранных белков-ферментов, так как позволяет фракционировать вещества в широких диапазонах pH, температуры, ионной силы без адсорбции на носителе молекул разделяемых соединений. Метод основан на принципе обратного молекулярного сита: более крупные молекулы быстрее проходят через слой мелких частиц носителя, а более мелкие (с диаметром меньше или равным диаметру пор в частице) — медленнее, так как диффундируют через поры инертного материала. В качестве молекулярных сит используют декстрановые, агарозные и поли-

акриламидные гели. Преимущество этого метода заключается в том, что он позволяет не только разделять, но и очищать и концентрировать макромолекулы (например, при добавлении к исследуемому раствору сухих гранул геля с диаметром пор меньше, чем диаметр молекул).

Для выделения различных мембранных структур используется и *аффинная хроматография*. Принцип этого метода заключается в способности выделяемого вещества специфически связываться с лигандом, “пришитым” к нерастворимому носителю, при пропускании раствора через матрицу. В качестве последней применяют сефарозы (агарозные гели), активируемые путем связывания различных лигандов: кофакторов, ингибиторов, субстратов мембранных белков-ферментов, лектинов в случае выделения гликопротеинов; гормонов, бромциана, конканавалина А — соответственно при получении мембран, антител или целых клеток. Элюирование исследуемого вещества осуществляют в условиях диссоциации комплекса лиганд — вещество и сохранения нативной структуры выделяемого соединения.

Заряженные компоненты биомембран разделяют *методом электрофореза* по скорости их движения в электрическом поле, которая зависит от величины заряда, молекулярной массы и формы молекул. Максимальное разделение макромолекул (в частности, мембранных белков) обеспечивается при использовании метода диск-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Его название “диск” происходит от дискретного напряжения электрического поля, что обусловлено прерывистым градиентом pH в системе. Верхняя часть полимеризующегося геля в стеклянной вертикальной трубке, на которую наносится исследуемый образец, имеет меньшую концентрацию, а нижняя часть (разделяющий гель) — большую. За счет большого размера пор верхних слоев геля и большого градиента электрического поля происходит быстрое движение и накопление вещества на верхней границе разделяющего геля, в котором в зависимости от подвижности разделяемых белков образуются различные зоны, которые идентифицируют после удаления геля из трубки. Для определения молекулярной массы мембранных белков используют SDS—ПААГ-электрофорез с применением додецилсульфата натрия (ДСН, SDS), связывающегося с белком и вызывающего его диссоциацию. Подвижность белка в комплексе с ДСН будет определяться только молекулярной массой биополимера, а заряд — до-

децилсульфатом (при постоянстве количества связываемого любого типа белка додецилсульфатом: 1,4—1,5 г ДСН на 1 г белка). Количественные измерения проводят оптическим методом с использованием денситометра.

Разновидность электрофореза — изоэлектрическое фокусирование. Метод основан на электрофоретическом разделении смеси белков в градиенте pH с достижением изоэлектрической точки (ИЭТ) каждого белка и его “фокусированием” в отдельной зоне и применяется для быстрого и эффективного фракционирования больших количеств (несколько граммов) образца на начальных стадиях его очистки.

5.3. ОЦЕНКА ЧИСТОТЫ МЕМБРАННЫХ ФРАКЦИЙ

Наиболее часто для оценки чистоты выделенных мембранных фракций используют методы исследования удельной активности ферментов, называемых маркерами. Маркерные ферменты должны быть локализованы в определенном типе мембранных структур и катализировать реакции, соответствующие специфическим функциям этих мембран. Кроме того, фермент можно использовать как маркер, если он прочно связан с мембраной и не подвергается активации или ингибированию при разделении мембранных фракций (табл. 17). Активность маркерных фермен-

Таблица 17

*Биохимические маркеры,
используемые для контроля чистоты мембранных фракций*

Мембранная фракция	Маркерный фермент
Плазматические мембраны	5'-Нуклеотидаза (КФ 3.1.3.5) Щелочная фосфатаза (КФ 3.1.3.1) Аденилатциклаза (КФ 4.6.1.1) Na ⁺ , K ⁺ -АТФаза (КФ 3.6.1.3)
Ядра	NAD-пиррофосорилаза (КФ 2.7.7.1)
Эндоплазматическая сеть	Глюкозо-6-фосфатаза (КФ 3.1.3.10)
Микросомы	NADPH-дегидрогеназа (КФ 1.2.1.16)
Пероксисомы	Каталаза (КФ 1.11.1.6)
Лизосомы	Кислая РНКаза (КФ 3.1.4.8) Кислая фосфатаза (КФ 3.1.3.2)
Саркоплазматический ретикулум	Ca ²⁺ -АТФаза (КФ 3.6.3.3)
Митохондрии: наружная мембрана внутренняя мембран	Моноаминоксидаза (КФ 1.4.3.4) Цитохромоксидаза (КФ 1.9.3.1) Цитохром-с-редуктаза (КФ 1.6.9.3)
Цитозоль	Лактатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.27)

тов контролируют на каждом этапе выделения и разделения мембран в исходном гомогенате и в каждой фракции с целью определения стадии осаждения и выхода исследуемых мембранных структур, а также потерь мембранных фракций. Гомогенность выделенного препарата мембран анализируют на основании увеличения активности маркерного фермента (-ов) в нем по сравнению с исходным гомогенатом клеток. Часто используют не один, а два-три мембранных маркера. Однако необходимо помнить, что и мембраны одного типа способны проявлять гетерогенность, связанную с асимметрией белкового, липидного и углеводного состава мембран, в результате чего фермент может находиться в латентной форме из-за нарушения ориентации мембраны и недоступности активного центра для субстрата, например, в обращенных мембранных везикулах. Наиболее легко из внутриклеточных органелл идентифицируют митохондрии и ядра, затем — лизосомы и пероксисомы, наиболее трудно — плазматические мембраны и мембраны эндоплазматической сети. Сложность разделения последних обусловлена близостью величин диапазона плотностей этих структур, поэтому разделение по скорости седиментации осуществляется в том случае, если плазматические мембраны представлены крупными фрагментами.

С целью преодоления недостатков вышеуказанного метода для оценки чистоты мембранных фракций удобнее использовать не ферменты, а специфические рецепторы лектинов, гормонов, антител. В том случае, если мембрана имеет четкие морфологические признаки, в качестве критерия применяют метод электронной микроскопии. Если хорошо изучен химический состав определенного типа мембран, то для контроля чистоты мембранных структур используют анализ белкового и липидного состава (например, методом электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН или путем определения содержания холестерина).

5.4. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

Исследование структурно-функционального состояния мембранных белков осуществляют после проведения двух важнейших этапов:

- выделения и очистки определенного белка;
- анализа полученной фракции для определения ее чистоты и исследования структуры чистого компонента.

В разделе 5.2. были охарактеризованы методы выделения мембранных структур, которые широко используются и для получения мембранных белков. Поэтому остановимся на некоторых вопросах, касающихся очистки интегральных мембранных белков с применением детергентов.

Детергенты — это группа амфифильных соединений, которые способны связываться с гидрофобными участками мембранных белков, контактирующими с липидной фазой мембран, тем самым разрушая ее структуру. В ходе солюбилизации мембран детергентами последние модифицируют бислой липидов, разрушая его, затем образуют смешанные (белок-липид-детергентные) мицеллы, а в конечном итоге — детергент-белковые и липид-детергентные мицеллы. Для сохранения мембранных белков в растворимом состоянии необходимо постоянное присутствие детергента. Его удаление приводит к агрегации и последующему осаждению молекул белка.

Основной проблемой очистки белков является подбор детергента и оптимальных условий солюбилизации их молекул. Детергент не должен нарушать высшие типы пространственной организации белков, а лишь замещать молекулы липидов, контактирующие с гидрофобными участками белковой глобулы. Критерий максимальной солюбилизации белка — переход его молекул в надосадочную жидкость после осаждения мембран. Причем важным требованием процедуры солюбилизации является сохранение функциональной активности биополимера и его стабилизация. Для этого в исследуемую систему добавляют экзогенные фосфолипиды, глицерин, ингибиторы протеаз. Следует отметить, что получаемые при очистке белок-детергентные комплексы могут содержать значительные количества связанных фосфолипидов, что необходимо учитывать при дальнейшем разделении и характеристике получаемого препарата белка.

При выборе детергента необходимо учитывать:

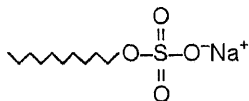
- 1) критическую концентрацию мицеллообразования и размер мицелл детергента;
- 2) заряд детергента;
- 3) возможность осаждения при определенном значении pH;
- 4) возможность светопоглощения в диапазоне длин волн, используемом при определении концентрации белка оптическим методом (при 280 нм).

Если концентрация детергента превышает критическую концентрацию мицеллообразования, то детергент полностью солюбилизирует мембранные структуры. В противоположном случае (концентрация меньше ККМ) детергент модифицирует мембрану, не разрушая полностью липидный бислой. Кроме того, необходимо учитывать зависимость этого параметра от температуры и ионной силы среды. Детергенты с низкой ККМ, образующие крупные мицеллы, вследствие низкой концентрации мономеров не способны полностью удаляться при диализе или ультрафильтрации, что может привести к денатурации белка при накоплении молекул детергента. Поэтому удобнее пользоваться детергентами с высокими значениями ККМ (цвиттерионные детергенты, соли желчных кислот, октилглюкозид). Еще одной характеристикой детергента является его агрегационное число. Это количество молекул, входящих в состав одной мицеллы. Детергенты с высоким агрегационным числом образуют выраженные мицеллярные структуры, которые внедряются в липидный бислой и солюбилизируют его. Детергенты с низким агрегационным числом не способны образовывать собственные мицеллы и лишь встраиваются в бислой липидов.

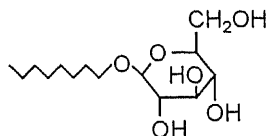
Выбор детергента для выделения и очистки определенного мембранного белка осуществляется методом проб и ошибок, однако исследователи стремятся к использованию минимальных концентраций детергента с целью сохранения нативного структурно-функционального состояния изучаемого белка. Наиболее эффективными считают неионные детергенты (третон X-100, октилглюкозид), соли желчных кислот (холат, дезоксихолат), цвиттерионные детергенты.

На рис. 60 приведены структурные формулы, а в табл. 18 описаны свойства некоторых детергентов, используемых для выделения и очистки мембранных белков. Необходимо отметить, что свойства растворов солей желчных кислот существенно зависят от температуры, pH, ионной силы. Эти соединения способны к образованию гелей при сдвиге pH на единицу выше pKa (для холата — 5,2, для дезоксихолата — 6,2).

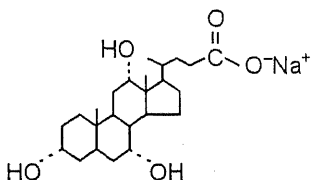
Додецилсульфат натрия



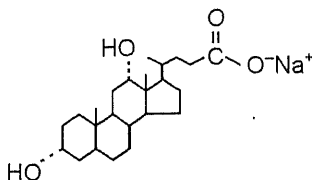
β -D-Октилглюкозид



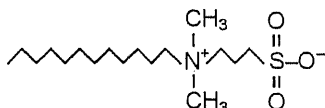
Холат натрия



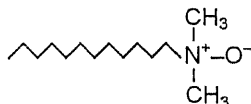
Дезоксихолат натрия



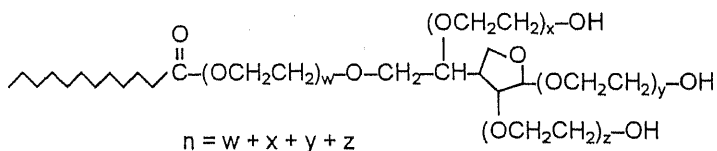
Сульфобетаины (Цвиттергенты)



Лаурилдиметиламиноксид
(Додециламин-N-оксид)



Эфиры жирных кислот полиоксиэтиленсорбитана
(C_x-сорбитан-E_n) серии Твин

Полиоксиэтилен-пара-трет-октилфенолы (трет-С₈ Ø Е_н):

Тритон X-100, $n = 9-10$

Тритон X-114, n = 7-

Нонидет Р-40, n = 9

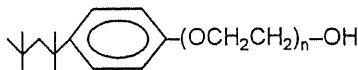


Рис. 60. Структурные формулы некоторых детергентов, используемых в мембранологии

Таблица 18

Свойства некоторых детергентов

Детергенты	ККМ, ммоль/л	Молеку- лярная масса	Размер мицелл	Агрега- ционное число	Удельный объем, мл/г
Додецилсульфат натрия (анионный детергент)	1,33	288	24500	85	0,864
Холат натрия (0,15 ммоль/л NaCl, 20 °C, pH 9,0)	3	408	2100	5	0,778
Дезоксихолат натрия (0,15 ммоль/л NaCl, 20 °C, pH 9,0)	0,91	392	2300	55	0,771
Тритон X-100 (незаряженный детергент)*	0,24	628	90000	140	0,908
Твин 80 (незаряженный детергент)*	0,012	1300	76000	60	0,896
β -D-октилглюкозид (незаряженный детергент)	25	293	8000	27	0,820
Лаурилдиметиламиноксид (цивиттерионный детергент)	2,2	229	17000	75	1,112
Цвиттергент 3—12 (цивиттерионный детергент)	3,6	335	—	—	0,957

* Полидисперсная смесь, приведены средние значения.

5.5. ВЫДЕЛЕНИЕ И ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ЛИПИДОВ МЕМБРАН

Выделение липидов мембран осуществляют сразу после получения мембранной фракции, которую необходимо защищать от действия протео- и липолитических ферментов, автоокисления. Обычно все процедуры проводят при низкой температуре, поддерживая определенные значения pH и ионной силы. Для экстракции липидов используют смесь хлороформ—метанол. Для одновременной экстракции белков и липидов из теней эритроцитов их экстрагируют смесью бутанол—вода. При этом большая часть белков переходит в водный, а липиды — в бутанольный слой.

Дальнейший анализ липидов проводят методами гидролиза и количественного определения компонентов сложных смесей фосфолипидов. В результате избирательного гидролиза липидов мембран образуются продукты, которые можно разделить по полярности или по остающимся неполярным группам. Описаны различные способы щелочного или кислотного гидролиза мембранных липидов. При использовании ферментативного гидролиза

(например, с помощью фосфолипаз) расщепляются только строго определенные связи при сохранении всех остальных.

Количественный анализ сложных смесей фосфолипидов проводят хроматографическими методами. Для препаративных целей в основном используют хроматографию на колонках. Для микроаналитических исследований успешно применяют тонкослойную хроматографию, с помощью которой можно разделить практически все классы липидов, локализовать и идентифицировать их при использовании специальных реактивов.

Для тонкослойной хроматографии липидов применяют слои мелкозернистого силикагеля (силикагель Н). Для аналитических целей используют слой сорбента толщиной 0,25 мм, для препаративных — 0,5 мм. Размер стеклянной пластинки для разделения чаще всего — 20×20 см. Для разделения различных классов липидов используют разные системы растворителей. Например, полярные фосфолипиды и гликофинголипиды разделяют в смеси хлороформ—метанол, содержащей аммиак или разведенную уксусную кислоту. Элюирующая способность смесей растворителей определяется полярностью ее составных компонентов.

По элюирующей способности растворители располагаются в следующем возрастающем порядке: петролейный эфир, циклогексан, четыреххлористый углерод, толуол, бензол, хлороформ, диэтиловый эфир, этилацетат, ацетон, n-пропанол, этанол, метанол, вода. После пропускания растворителей пластинку высушивают на воздухе и идентифицируют липиды с помощью окрашивания специфическими реагентами. Для количественного определения фосфолипидов, разделенных тонкослойной хроматографией, используют спектрофотометрические методы.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие методы исследования биомембран относят к биохимическим?
2. Каковы особенности биофизических методов изучения биомембран?
3. Дайте характеристику оптических методов исследования биомембран.
4. Охарактеризуйте основные этапы выделения и разделения биомембран.
5. Какие методы используют для выделения мембран из гомогенатов клеток и тканей?

6. Какие критерии применяют для оценки чистоты мембранных фракций?

7. Какие требования предъявляют к маркерным ферментам? Назовите маркерные ферменты различных мембранных структур клетки.

8. С какой целью в мембранологии применяют детергенты? Что они представляют собой, каковы их свойства?

9. Почему критическую концентрацию мицеллообразования считают важной характеристикой детергентов?

10. Опишите принципы, классификацию и области применения методов хроматографии и электрофореза для исследования биомембран.

11. Охарактеризуйте стадии выделения, разделения и количественного определения липидного состава мембран.

12. Какова физическая природа люминесценции?

Глава 6

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНО- ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ БИОМЕМБРАН В НОРМЕ И ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

6.1. ВЫДЕЛЕНИЕ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАН

Удобной моделью для изучения структурно-функциональных модификаций биомембран, индуцированных воздействием целого ряда физико-химических агентов, являются эритроцитарные мембраны и клетки, что обусловлено следующими причинами:

- однородностью мембранного препарата, легкостью его получения с сохранением нативных свойств;

- выполнением эритроцитарными мембранами различных функций: барьерной, транспортной, рецепторной, механической, метаболической и др.;

- наличием в эритроцитарных мембранах и клетках ферментных систем, регулирующих энергетические, окислительные процессы, транспорт ионов, пероксидное окисление липидов; генерирующих и утилизирующих активные формы кислорода.

Тени эритроцитов, полученные путем гипоосмотического гемолиза и отмытые от гемоглобина в изотоническом буфере, содержат около 50 % белков, 43 % липидов и 7 % углеводов. Белковые компоненты мембраны были идентифицированы методом электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия. В соответствии с локализацией их подразделяют на периферические и интегральные (см. главу 1). Периферические белки расположены на поверхности мембраны и им соответствуют полипептидные полосы 1, 2, 4, 5 и 6. Интегральные белки погружены в липидный бислой и в некоторых случаях пронизывают его. Основным интегральным белком является белок полосы 3, осуществляющий транспорт анионов через мембрану. Его N-конец находится с цитоплазматической стороны, а С-конец погружен в бислой с наружной стороны мембраны. Периферические белки взаимодействуют друг с другом, образуя двумерный каркас, выстилающий внутреннюю поверхность эритроцитарной мембраны, который называют мембранным скелетом. Он содер-

жит около 50 % общего количества белков эритроцитарной мембраны. Его основными компонентами являются спектрин (полосы 1 и 2), актин (полоса 5), а также белки полосы 4.1. и 4.9. (см. раздел 1.2.1). Считают, что актин-спектриновая сеть с помощью якорного белка анкирина связана с фосфолипидным матриксом через цитоплазматический участок белка полосы 3.

Липиды в мембранах эритроцитов находятся почти исключительно в форме бислоя. По данным ЯМР, в эритроцитах человека таких липидов не менее 97 %. Вязкость липидного бислоя мембран эритроцитов выше, чем для других мембран. Это обусловлено высоким содержанием в них холестерина. В табл. 2—4 “Приложения” дана подробная количественная характеристика состава липидов и фосфолипидов мембран эритроцитов млекопитающих, а также жирнокислотного состава фосфолипидов в эритроцитах человека и быка.

Лабораторная работа № 1

Выделение эритроцитарных мембран из крови доноров

Материалы и оборудование: кровь доноров с антикоагулянтом, хлорид натрия, трисгидроксиметиламинометан (трис), соляная кислота, этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), центрифужные пробирки, центрифужные весы, центрифуга MPW-360, центрифуга ЦЛР-1.У 4.2, рН-метр, пастеровские пипетки, фильтровальная бумага.

Ход работы

Кровь с антикоагулянтом (3,8 %-ный раствор цитрата натрия в соотношении кровь: цитрат — 9:1) необходимо центрифугировать при 3000 об/мин на центрифуге MPW-360 в течение 10 мин. Плазму и верхний слой лейкоцитов аккуратно отобрать пастеровской пипеткой и удалить. Эритроциты три раза промыть охлажденным раствором, содержащим 0,145 моль/л NaCl в 0,02 моль/л трис-HCl буфере (pH 7,6 при 20 °C), каждый раз осажая клетки в том же режиме (при 3000 об/мин в течение 10 мин). Мембраны эритроцитов получают с помощью гипосмотического гемолиза их раствором, содержащим 10 ммоль/л ЭДТА в 10 ммоль/л трис-HCl буфере (pH 7,6 при 20 °C). Для этого один объем отмытых эритроцитов быстро и энергично перемешать с 20 объемами охлажденной до +4 °C гемолизирующей среды и выдержать при этой температуре в течение 15 мин. Гемолизат

центрифугировать на центрифуге ЦЛР-1 У4.2 при 18000 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость удалить, а осадок мембран промыть три раза 20 объемами 10 ммоль/л трис-HCl буфера (pH 7,6 при 20 °C), каждый раз осаждая мембраны в том же режиме.

В экспериментах использовать свежеприготовленную суспензию мембран.

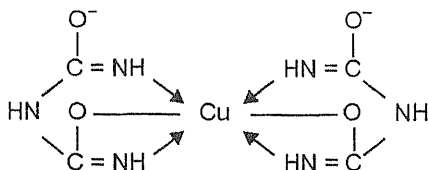
Препараты мембран эритроцитов можно получить с помощью метода молекулярного сита. Для этого применяют гель-хроматографию на сефарозе 4В ("Pharmacia", Швеция). Сефароза 4 В представляет собой гель агарозы, которая поставляется в набухшем состоянии. Преимущество этого геля по сравнению с другими носителями для хроматографии заключается в его способности разделять комплексы биополимеров, полисахариды, мембраны и фрагменты клеток. Для эффективного отделения гемоглобина от мембран необходимо лизировать эритроциты не менее, чем двумя объемами буфера. Установлены оптимальные условия для разделения на сефарозе 4В: 4 ммоль/л фосфатный буфер (pH 7,5). На колонку размером 1,5×5,1 см можно наносить до 1 мл гемолизата (гемолизат должен быть приготовлен из расчета 1 объем эритроцитов : 1 объем гемолизирующей среды), при этом выход мембран составляет до 1 мл. Методом электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия показано, что мембраны, выделенные гель-хроматографией, содержат тот же набор белков, что и мембраны, полученные методом промывания и центрифугирования.

Лабораторная работа № 2

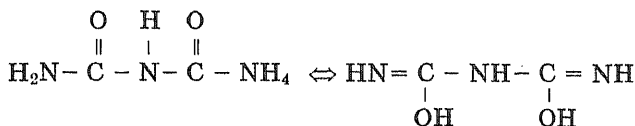
Определение концентрации белка плазматических мембран по методу Лоури

При выделении препарата мембран оценивают количественный выход белка. Метод Лоури (1951) – наиболее распространенный и высокочувствительный метод определения концентрации белка, основанный на измерении интенсивности окраски раствора, зависящей от концентрации белка. Принцип метода заключается в том, что при взаимодействии белка с реактивами, используемыми в определении, осуществляются по меньшей мере две цветные реакции на белок. Одна из них — биуретовая реакция между пептидными группами и ионами меди. Возникающая сине-фиолетовая окраска обусловлена об-

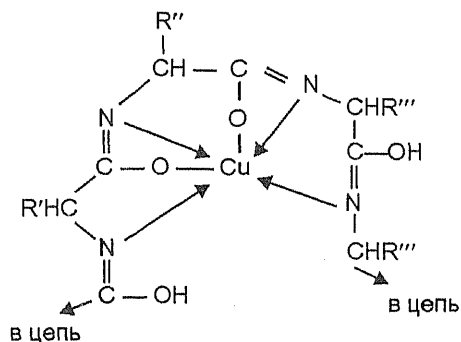
разованием комплексного соединения — биуретового медного комплекса:



Такое комплексное соединение претерпевает в щелочной среде енолизацию по схеме:



Две молекулы диенольной формы биурета взаимодействуют с гидроксидом меди (II) и образуют комплексное соединение, в котором координационные связи образованы за счет электронных пар атомов азота иминных групп:



Такие медные комплексы обладают преимущественно фиолетовой и синей окраской.

Вторая реакция — это реакция реактива Фолина с тирозиновыми и цистеиновыми радикалами молекулы белка. Это реакция восстановления смеси фосфорно-вольфрамовой и фосфорно-молибденовой кислот (реактив Фолина) с образованием комплексного соединения синего цвета. Полагают, что в реакции восстановления принимают участие комплексные соединения меди, возникающие при взаимодействии белка со щелочным раствором сульфата меди. Эта реакция не очень специфична, но высо-

кочувствительна. Преимущество метода Лоури состоит в возможности определения белка в сильно разбавленных растворах (десятки мкг).

Материалы и оборудование: вольфрамат натрия $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, молибдат натрия $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 80 %-ная фосфорная кислота, концентрированная соляная кислота, сульфат лития, бром, гидроксид натрия, карбонат натрия, тартрат натрия, сульфат меди, бычий сывороточный альбумин, суспензия мембран, фотоэлектроколориметр КФК-3 или спектрофотометр СФ-46, стеклянные кюветы для КФК, стеклянные пробирки, пипетки, фильтровальная бумага.

Ход работы

Реактив Фолина готовят следующим образом: 100 г вольфрамата натрия и 25 г молибдата натрия растворяют в 700 мл воды в круглодонной колбе на 1 л, снабженной пришлифованным холодильником Либиха. Прибавляют 50 мл 80 %-ной фосфорной кислоты и 100 мл концентрированной соляной кислоты. Помещают в колбу несколько капилляров. Смесь кипятят в колбе с обратным холодильником в течение 10 ч. Далее прибавляют 150 г сульфата лития, 50 мл воды и несколько капель брома. Для удаления избытка брома кипятят содержимое колбы в течение 15 мин без обратного холодильника под тягой. Раствор охлаждают, доводят водой до 1 л и пропускают через стеклянный фильтр. Реактив Фолина хранят в химической посуде из темного стекла. На всех этапах приготовления реактива цвет реакционной смеси должен быть желтым. Реактив Фолина титруют 1 н раствором щелочи и на основании полученных данных рассчитывают его кислотность. Перед использованием реактив Фолина разбавляют водой до кислотности, соответствующей 1 н раствору соляной кислоты.

Далее готовят рабочий раствор: в цилиндр на 100 мл наливают 50 мл 2 %-ного раствора Na_2CO_3 , в отдельную пробирку — 0,5 мл 2 %-ного тартрата натрия и 0,5 мл 1 %-ного сульфата меди. Содержимое пробирки выливают в цилиндр и образовавшейся смесью ополаскивают пробирку и опять выливают в цилиндр. Смесью перемешивают и оставляют на 10 мин.

В пробирки разливают по 0,1 мл суспензии мембран, затем — по 0,1 мл 0,4 н раствора NaOH (пробирки можно нагреть для лучшего растворения белка). Добавляют бидистиллированную

воду до 0,4 мл. Смешивают с 2 мл рабочего раствора, перемешивают содержимое пробирок и оставляют при комнатной температуре на 10 мин. Затем добавляют 0,2 мл реактива Фолина, перемешивают и оставляют на 30—40 мин для развития окраски. Измеряют оптическую плотность растворов при длине волны 750 нм на спектрофотометре или фотоэлектроколориметре. Содержание белка в пробах определяют по калибровочному графику, построенному с использованием бычьего сывороточного альбумина. Для этого готовят серию растворов белка с содержанием от 20 до 400 мкг в 1 мл. Определение ведут так же, как и для опытных растворов (см. выше), количество повторностей для каждой концентрации белка — не менее 5. Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс содержание белка в пробе, а по оси ординат — ее оптическую плотность при 750 нм.

Лабораторная работа № 3

Количественное определение белка по биуретовой реакции

Материалы и оборудование: сульфат меди, гидроксид натрия, хлорид натрия, тартрат натрия-калия, йодид калия, бычий сывороточный альбумин, суспензия мембран, фотоэлектроколориметр КФК-3 или спектрофотометр СФ-46, стеклянные кюветы для КФК, стеклянные пробирки, пипетки, фильтровальная бумага.

Ход работы

Для приготовления биуретового реактива в мерную посуду на 250 мл вносят 0,375 г сульфата меди; 1,5 г тартрата натрия-калия и растворяют в 150 мл воды. При энергичном перемешивании добавляют 75 мл 10 %-ного раствора NaOH и 1 г йодида калия и доводят содержимое до 250 мл водой. Реактив хранят в полиэтиленовом сосуде, покрытом изнутри парафином, так как он не подлежит длительному хранению.

В пробирки помещают по 0,2 мл исследуемого раствора, содержащего белок, доводят бидистиллированной водой до 1 мл, добавляют 4 мл биуретового реактива и перемешивают. В контрольную пробирку вместо белка наливают воду. Через 30 мин измеряют оптическую плотность проб (развивается сине-фиолетовое окрашивание за счет пептидных связей) при длинах волн 540—650 нм против контроля (для более точного определения зарегистрировать спектр поглощения проб и выявить $\lambda_{\max}$ против контрольного раствора).

Содержимое белка в пробах определяют по калибровочному графику с использованием бычьего сывороточного альбумина. Стандартные растворы бычьего сывороточного альбумина должны содержать от 1 до 10 мг белка в 1 мл 1 %-ного раствора хлорида натрия. Определение ведут так же, как в случае опытных проб.

6.2. ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ ФЕРМЕНТОВ В НОРМЕ И ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Для исследования отдельных свойств нативных мембран клеток, а также для изучения молекулярных механизмов регулирования метаболических процессов, осуществляющихся с участием мембранных компонентов клетки, используются различные физико-химические методы модификации мембран.

Химические способы модификации мембранных структур связаны с использованием естественных и синтетических соединений. К группе естественных модифицирующих агентов, изменяющих липидный состав мембран в нативной клетке, относятся липидпереносящие белки, ферменты обмена фосфолипидов — фосфолипазы, диметилазы, системы обмена холестерина. Они регулируют микровязкость и подвижность мембранных компонентов, которые являются важнейшими факторами поддержания нормальной структурно-функциональной организации и обеспечения взаимодействия мембран.

Синтетические биологически активные вещества используют для индукции проницаемости природных и искусственных мембран. К ним относятся ионофоры (валиномицин, обеспечивающий проникновение ионов калия через мембрану; крауны — макроциклические полиэфиры, обеспечивающие проницаемость мембран для ионов натрия, кальция, магния) и каналобразователи (например, аламетицин, способствующий проникновению через мембрану АТР).

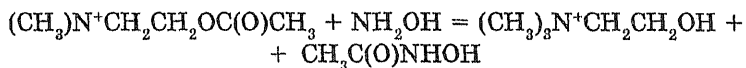
К физическим методам модификации липидных и белковых компонентов биомембран относят ионизирующее и УФ-излучение, температуру.

Лабораторная работа № 4

Определение функциональной активности ацетилхолинэстеразы эритроцитарных мембран

Метод Хестрина основан на колориметрическом определении концентрации ацетилхолина. Его чувствительность составляет 5 мкг ацетилхолина. Ошибка определения $\pm 1\%$. Достоинство этого метода при определении активности АХЭ состоит в том, что он позволяет исследовать кинетику ферментативной реакции при различных условиях, позволяет работать в широком интервале концентраций субстрата, производить массовые определения, удобен для регистрации активности АХЭ различного происхождения в стандартных условиях (определенные концентрации фермента и субстрата, стандартное время реакции при условии соблюдения нулевого порядка).

Принцип метода: при взаимодействии ацетилхолина с щелочным раствором гидроксиламинхлорида образуется ацетилгидроксамовая кислота, которая в кислом растворе дает с хлорным железом цветную реакцию:



Материалы и оборудование: 2 моль/л раствор солянокислого гидроксилamina, 10 %-ный раствор хлорного железа, приготовленный на 0,1 моль/л растворе соляной кислоты, 3,5 моль/л раствор гидроксида натрия, 0,1 моль/л раствор соляной кислоты, ацетилхолинхлорид, фотоэлектроколориметр КФК-3 или спектрофотометр СФ-46, кровь доноров, стеклянные пробирки, пипетки, фильтровальная бумага.

Ход работы

Предварительно выделить мембраны эритроцитов из крови согласно методике, описанной в лабораторной работе № 1.

Для построения калибровочного графика необходимо приготовить растворы ацетилхолинхлорида с концентрациями 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 ммоль/л ацетилхолинхлорида. Определить оптическую плотность этих растворов против раствора сравнения (последовательность операций см. ниже). Построить калибровочный график, где по оси ординат отложена оптическая плотность растворов ацетилхолинхлорида, а по оси абсцисс — концентрация этого вещества. В пределах указанных концент-

раций ацетилхолина калибровочная прямая должна подчиняться закону Бугера—Ламберта—Бера.

Для приготовления раствора сравнения в пробирку налить реактивы в такой последовательности: 2 мл раствора хлорного железа, 2 мл соляной кислоты, 1 мл щелочного гидроксилamina, 1 мл 2,5 ммоль/л раствора ацетилхолинхлорида и 1 мл дистиллированной воды. Цвет смеси должен быть лимонно-желтым.

В контрольную и опытную пробирки налить соответственно по 1 мл бидистиллированной воды и суспензии мембран эритроцитов. Затем добавить в них по 2 мл 2,5 ммоль/л раствора ацетилхолинхлорида и поместить пробирки в термостат при 37 °C на 15 мин. После термостатирования прилить по 1 мл раствора щелочного гидроксилamina (готовят перед употреблением путем смешивания равных объемов раствора солянокислого гидроксилamina и гидроксида натрия). Через 15 мин в опытную и контрольную пробы добавить по 2 мл раствора соляной кислоты и по 2 мл раствора хлорного железа. Через 20 мин оптическую плотность опытной и контрольной проб измерить на фотоэлектроколориметре против раствора сравнения. Для расчета активности фермента из величины оптической плотности контрольной пробы вычитают величину оптической плотности опытной пробы. Активность ацетилхолинэстеразы выражают в ммоль/л ацетилхолина с использованием калибровочного графика.

Лабораторная работа № 5

Исследование УФ-индуцированных изменений функциональной активности ацетилхолинэстеразы эритроцитарных мембран

Материалы и оборудование: 2 моль/л раствор солянокислого гидроксилamina, 10 %-ный раствор хлорного железа, приготовленный на 0,1 моль/л растворе соляной кислоты, 3,5 моль/л раствор гидроксида натрия, 0,1 моль/л раствор соляной кислоты, ацетилхолинхлорид, фотоэлектроколориметр КФК-3 или спектрофотометр СФ-46, установка для УФ-облучения, кровь доноров, стеклянные пробирки, пипетки, фильтровальная бумага.

Ход работы

Предварительно выделить мембраны эритроцитов из крови согласно методике, описанной в лабораторной работе № 1.

Один объем (3 мл) суспензии мембран эритроцитов использовать в качестве контрольного образца и разлить по трем пробиркам, второй (9 мл) — разделить на три части (по 3 мл) и подвергнуть воздействию УФ-света в дозах 0,75; 2,27; 3,78 кДж/м² при помощи установки для ультрафиолетового облучения биосистем, которая подробно описана в учебном пособии В. Г. Артюхова, О. В. Путинцевой (1996). Облучение суспензии мембран эритроцитов в трис-НСI буферном растворе (рН 7,6) проводят в стеклянной термостатируемой кювете (20±1 °С) при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки излучением лампы типа ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 (с полосой пропускания 240—390 нм). Интенсивность облучения через этот светофильтр составляет 0,151 кДж/м² в 1 мин. Затем определить каталитическую активность ацетилхолинэстеразы в контрольных и опытных (при всех дозах облучения) пробирках по методике, описанной в лабораторной работе № 4. Полученные данные занести в табл. 19.

Таблица 19

Ферментативная активность ацетилхолинэстеразы мембран эритроцитов человека до и после УФ-облучения

Образец	Активность ацетилхолинэстеразы, ммоль/л ацетилхолина				Активность АХЭ, % от исходного уровня
	1-е опреде- ление	2-е опреде- ление	3-е опреде- ление	$\bar{A} \pm S_A$	
Контроль					100 %
Доза 0,75 кДж/м ²					
Доза 2,27 кДж/м ²					
Доза 3,78 кДж/м ²					

Сделать вывод о степени и характере изменений функциональной активности ацетилхолинэстеразы эритроцитарных мембран, модифицированных воздействием УФ-света в различных дозах. Какие процессы, протекающие при УФ-облучении эритроцитарных мембран, обуславливают изменения каталитической активности мембраносвязанной АХЭ? Какова зависимость ферментативной активности АХЭ эритроцитарных мембран от дозы УФ-облучения?

Лабораторная работа № 6

Исследование ферментативной активности свободной и мембраносвязанной ацетилхолинэстеразы в интактном состоянии и после УФ-облучения

Материалы и оборудование: 2 моль/л раствор солянокислого гидроксилamina, 10 %-ный раствор хлорного железа, приготовленный на 0,1 моль/л растворе соляной кислоты, 3,5 моль/л раствор гидроксида натрия, 0,1 моль/л раствор соляной кислоты, ацетилхолинхлорид, фотоэлектроколориметр КФК-3 или спектрофотометр СФ-46, установка для УФ-облучения, кровь доноров, готовый препарат ацетилхолинэстеразы из эритроцитов быка, стеклянные пробирки, пипетки, фильтровальная бумага.

Ход работы

Предварительно выделить мембраны эритроцитов из крови согласно методике, описанной в лабораторной работе № 1. Используя описание методики в лабораторной работе № 5, провести определение каталитической активности АХЭ эритроцитарных мембран в норме и при воздействии УФ-излучения в дозах 1,5; 3,0; 4,5 кДж/м². Данные занести в таблицу, аналогичную табл. 19. Те же эксперименты провести с буферными растворами свободной ацетилхолинэстеразы (10⁻⁸ моль/л). Оформить табл. 19 для фермента в свободном состоянии. Результаты представить в виде графика, где по оси абсцисс отложены величины доз УФ-света, а по оси ординат — значения активности АХЭ, выраженные в процентах от уровня контрольного образца, для свободного (кривая 1) и мембраносвязанного (кривая 2) фермента. Сделать вывод об уровне фоточувствительности разных форм фермента. Чем могут быть обусловлены различия в характере УФ-индуцированных изменений функциональной активности свободной и связанной АХЭ?

Лабораторная работа № 7

Определение функциональной активности ацетилхолинэстеразы эритроцитарных мембран после индукции пероксидного окисления липидов

Мембранные ферменты изменяют свою активность под влиянием продуктов ПОЛ, что может быть обусловлено образованием комплекса окисленный липид — белок, ассоциацией белко-

вых молекул и разрушением аминокислот, в частности, содержащих SH-группы.

Цель работы — выявление изменений функциональной активности АХЭ эритроцитарных мембран после индукции аскорбатзависимого пероксидного окисления липидов. Ионы Fe^{2+} оказывают каталитическое действие на образование пероксидов. При этом Fe^{2+} окисляется до Fe^{3+} , а функция аскорбиновой кислоты заключается в регенерации ионов за счет обратного восстановления Fe^{3+} до Fe^{2+} .

Материалы и оборудование: 2 моль/л раствор солянокислого гидроксилamina, 10 %-ный раствор хлорного железа, приготовленный на 0,1 моль/л растворе соляной кислоты, 3,5 моль/л раствор гидроксида натрия, 0,1 моль/л раствор соляной кислоты, ацетилхолинхлорид, сульфат железа FeSO_4 , аскорбиновая кислота, фотоэлектроколориметр КФК-3 или спектрофотометр СФ-46, кровь доноров, стеклянные пробирки, пипетки, фильтровальная бумага.

Ход работы

Выделить эритроцитарные мембраны по методике, описанной в лабораторной работе № 1. К 1 мл суспензии эритроцитарных мембран добавить 150 мкл смеси растворов FeSO_4 (100 мкмоль/л) и аскорбиновой кислоты (2 ммоль/л) и инкубировать 5, 15, 30, 45 и 60 мин при 37 °С. Затем провести определение ферментативной активности АХЭ нативных и модифицированных мембран. Параллельно исследовать уровень ТБК-реактивных продуктов пероксидного окисления липидов (см. лабораторную работу № 11). После завершения экспериментов сопоставить динамику изменений величин активности АХЭ в процессе развития ПОЛ эритроцитарных мембран и уровня накопленных окисленных продуктов липидов.

Лабораторная работа № 8

Исследование функциональной активности мембраносвязанной Na^+ , K^+ -АТФазы

Распространенные методы изучения функциональной активности Na^+ , K^+ -АТФазы основаны на определении количества неорганического фосфата, содержащегося в исследуемом растворе. Существуют различные методы обнаружения фосфата в биообъектах. Но все они основаны на том, что в кислой среде молибде-

новокислый аммоний и фосфорная кислота (ее соли) взаимодействуют между собой с образованием фосфомолибдата аммония, восстановление которого приводит к образованию смеси различных оксидов молибдена, имеющих синий цвет. Появившаяся окраска устойчива в течение 1—2 ч. Для ее стабилизации применяют CuSO_4 . Различные методы отличаются природой восстановителя и кислотностью среды, что определяет скорость реакции и чувствительность метода.

Материалы и оборудование: хлорид натрия, хлорид калия, хлорид магния, строфантин, ЭДТА, АТР, трис-НСI буфер (рН 7,4), трихлоруксусная кислота, термостат, аскорбиновая кислота, молибдат аммония, однозамещенный фосфат калия, фотоэлектроколориметр КФК-3 или спектрофотометр СФ-46, кровь доноров, стеклянные пробирки, пипетки, фильтровальная бумага.

Ход работы

Получить препарат мембран эритроцитов по методике, описанной в лабораторной работе № 1. В пробирки для определения общей АТФазной и Mg^{2+} -АТФазной активности внести по 1 мл суспензии мембран. В контрольные пробы вместо мембран внести 1 мл трис-НСI буфера. Добавить в пробирки для определения Mg^{2+} -АТФазной активности по 0,3 мл строфантина (0,025 %), в контрольные и опытные пробирки для определения общей АТФазной активности — по 0,3 мл буфера, перемешать и через 30 мин в каждую пробирку внести по 1 мл инкубационной среды. Она содержит: 100 ммоль/л NaCl, 10 ммоль/л KCl, 3 ммоль/л MgCl_2 , 1 ммоль/л ЭДТА, 5 ммоль/л АТР, 50 ммоль/л трис-НСI буфер (рН 7,4). Далее термостатировать содержимое пробирки в течение 1 ч при 37 °С. Реакцию остановить добавлением 0,5 мл 20 %-ной трихлоруксусной кислоты. Белок удалить центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 мин.

Количество образующегося фосфата определяют по методу с применением аскорбиновой кислотой, который включает использование следующих реактивов:

- а) аскорбиновая кислота — 10 %-ный раствор;
- б) молибдат аммония — 0,42 %-ный раствор, приготовленный на 1 н серной кислоте;
- в) смесь, состоящая из одного объема раствора (а) и шести объемов раствора (б). Готовится непосредственно перед работой и хранится в течение дня в ледяной бане.

К 0,9 мл исследуемого раствора, содержащего 0,03—0,2 мкмоль неорганического фосфата, добавить 2,1 мл реактива (в). Перемешать и инкубировать 20 минут при 45 °С или 60 мин при 37 °С. После охлаждения измерить величину оптической плотности при 620 нм против контрольной пробы, содержащей вместо исследуемого раствора бидистиллированную воду. По разнице между полученными значениями общей АТФазной и Mg^{2+} -АТФазной активности найти активность Na^+ , K^+ -АТФазы эритроцитарных мембран с помощью калибровочного графика.

Для построения калибровочной прямой в пробирки налить по 0,15; 0,30; 0,50; 0,70 и 0,90 мл стандартного раствора неорганического фосфата, содержащего 0,23 мкмоль/л фосфата (KH_2PO_4) в 1 мл. Довести объем в каждой пробирке до 1 мл бидистиллированной водой и далее обрабатывать, как указано выше. Зарегистрировать оптическую плотность проб и полученные данные изобразить графически, откладывая по оси абсцисс содержание фосфата в пробе, а по оси ординат — оптическую плотность при 620 нм.

Активность фермента рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{(\Delta D_{\text{общ}} - \Delta D_{Mg}) \cdot 10^6}{K \cdot j \cdot t \cdot 31},$$

где $\Delta D_{\text{общ}} = D_{\text{общ}} - D_k$ — разность величин оптической плотности раствора для определения общей АТФазной активности и контрольного раствора; $\Delta D_{Mg} = D_{Mg} - D_k$ — разность величин оптической плотности раствора для определения Mg^{2+} -АТФазной активности и контрольного раствора; K — калибровочный коэффициент,

определяемый по формуле: $K = \frac{D}{c}$ (D в абсолютных величинах для определенной концентрации, c — значение концентрации); j — количество белка в пробе; t — время инкубации (мин); 31 — молекулярная масса фосфора.

Активность Na^+ , K^+ -АТФазы выражают в нмоль P_n /мг (белка) в мин или в мкмоль/л P_n /мл теней в час.

Лабораторная работа № 9

Изучение УФ-индуцированных изменений функциональных свойств Na^+ , K^+ -АТФазы эритроцитарных мембран

Материалы и оборудование: хлорид натрия, хлорид калия, хлорид магния, строфантин, ЭДТА, АТР, трис- HCl буфер (рН 7,4),

трихлоруксусная кислота, термостат, аскорбиновая кислота, молибдат аммония, однозамещенный фосфат калия, сульфат железа, фотоэлектроколориметр КФК-3 или спектрофотометр СФ-46, установка для УФ-облучения биообъектов, кровь доноров, стеклянные пробирки, пипетки, фильтровальная бумага.

Ход работы

Предварительно выделить мембраны эритроцитов из крови согласно методике, описанной в лабораторной работе № 1.

Один объем (3 мл) суспензии мембран эритроцитов использовать в качестве контрольного образца и разлить по трем пробиркам, второй (9 мл) — разделить на три части (по 3 мл) и подвергнуть воздействию УФ-света в дозах 0,75; 2,27; 3,78 кДж/м² при помощи установки для ультрафиолетового облучения биосистем. Облучение суспензии мембран эритроцитов в трис-НСI буферном растворе (рН 7,6) проводят в стеклянной термостатируемой кювете (20±1. °С) при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки излучением лампы типа ДРТ-400 через светофильтр УФС-1. Затем следует определить каталитическую активность Na⁺, K⁺-АТФазы в контрольных и опытных (при всех дозах облучения) пробирках по методике, описанной в лабораторной работе № 8. Данные занести в табл. 20.

Таблица 20

Ферментативная активность Na⁺, K⁺-АТФазы мембран эритроцитов человека после УФ-облучения

Образец	Активность Na ⁺ , K ⁺ -АТФазы, мкмоль/л P _n /мл теней в час				Активность АТФазы, % от исходного уровня
	1-е определение	2-е определение	3-е определение	$\bar{A} \pm S_A$	
Контроль					100 %
Доза 0,75 кДж/м ²					
Доза 2,27 кДж/м ²					
Доза 3,78 кДж/м ²					

Сделать вывод о характере изменений функциональной активности Na⁺, K⁺-АТФазы эритроцитарных мембран, модифицированных воздействием УФ-света в различных дозах. Какие процессы, протекающие при УФ-облучении эритроцитарных мемб-

ран, обуславливают изменения каталитической активности мембраносвязанной АТФазы? Какова зависимость ферментативной активности Na^+ , K^+ -АТФазы эритроцитарных мембран от дозы УФ-облучения?

Лабораторная работа № 10

Определение ферментативной активности Na^+ , K^+ -АТФазы эритроцитарных мембран после индукции пероксидного окисления липидов

Материалы и оборудование: хлорид натрия, хлорид калия, хлорид магния, строфантин, ЭДТА, АТР, трис-НСl буфер (рН 7,4), трихлоруксусная кислота, термостат, аскорбиновая кислота, молибдат аммония, однозамещенный фосфат калия, фотоэлектроколориметр КФК-3 или спектрофотометр СФ-46, кровь доноров, стеклянные пробирки, пипетки, фильтровальная бумага.

Ход работы

Выделить эритроцитарные мембраны по методике, описанной в лабораторной работе № 1. К 1 мл суспензии эритроцитарных мембран добавить 150 мкл смеси растворов FeSO_4 (100 мкмоль/л) и аскорбиновой кислоты (2 ммоль/л) и инкубировать 5, 15, 30, 45 и 60 мин при 37 °С. Затем провести определение ферментативной активности Na^+ , K^+ -АТФазы нативных и модифицированных мембран. Параллельно исследовать уровень ТБК-реактивных продуктов пероксидного окисления липидов (см. лабораторную работу № 11). После завершения экспериментов сопоставить динамику изменений величин активности Na^+ , K^+ -АТФазы в процессе развития ПОЛ эритроцитарных мембран и уровня накопленных окисленных продуктов липидов.

6.3. ИССЛЕДОВАНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ПРОТЕКАНИЯ ПРОЦЕССА ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ МЕМБРАН

В зависимости от конкретной цели исследований могут быть использованы различные физико-химические методы количественного определения молекулярных продуктов ПОЛ мембран или общей оценки динамики протекания свободнорадикальных процессов окисления. При количественном изучении первичных, промежуточных и конечных продуктов пероксидного окисления определяют разность концентраций радикальных интермедиа-

тов до и после процесса окисления с использованием оптических методов анализа, хроматографии, полярографии, амперометрического титрования. При оценке интенсивности свободнорадикальных реакций ПОЛ получают информацию, суммарно характеризующую соотношение скоростей образования и разложения пероксидов, изменения активности антиокислительных ферментов, уровня анти- и прооксидантов в модифицированных мембранах.

Так, например, йодометрический (амперометрический) метод количественной оценки продуктов ПОЛ основан на определении концентрации свободного йода или трийодина, образующихся при восстановлении пероксидных групп йодид-ионом.

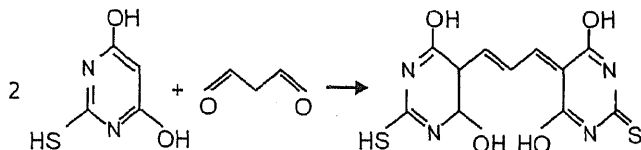
К оптическим методам количественного анализа продуктов пероксидного окисления липидов относят целый ряд методов: УФ-спектрофотометрию для обнаружения гидропероксидов, исследование уровня гидропероксидов с использованием тиоцианата аммония, определение промежуточных продуктов ПОЛ по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-тест), диеновых конъюгатов ненасыщенных жирных кислот, флуоресцентный анализ шиффовых оснований — конечных продуктов ПОЛ и др.

Хемилюминесцентные методы, используемые для интегральной оценки процессов ПОЛ, основаны на регистрации оптического излучения, возникающего в результате спонтанных или инициируемых в биологических пробах химических реакций.

Лабораторная работа № 11

Определение уровня продуктов пероксидного окисления липидов мембран с использованием тиобарбитуровой кислоты

В основе метода лежит реакция 2-тиобарбитуровой кислоты (ТБК) с промежуточными продуктами ПОЛ, в результате которой образуется окрашенный триметиновый комплекс с максимумом поглощения при 532 нм:



Считают, что главная роль при образовании этого окрашенного продукта принадлежит малоновому диальдегиду (МДА).

Материалы и оборудование: тиобарбитуровая кислота, трихлоруксусная кислота, буферный раствор с pH 7,4 (см. табл. 7 Приложения), центрифуга, водяная баня, фотоэлектроколориметр КФК-3.

Ход работы

Тканевой гомогенат или суспензию мембран в буферном растворе (pH 7,4) в объеме 2,5 мл поместить в центрифужные пробирки и добавить 1 мл 17 %-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Центрифугировать 10 мин при 4000 об/мин. Отобрать надосадочную жидкость и 2 мл ее перенести в пробирку, в которую налить 1 мл 0,8 %-ного раствора ТБК, и закрыть ее. Пробирку поместить на водяную баню при 100 °С на 10 мин. Затем пробу охладить и зарегистрировать оптическую плотность на фотоэлектроколориметре КФК-3 при длине волны 532 нм. В качестве контроля использовать буферный раствор вместо супернатанта. Количество промежуточных продуктов ПОЛ (МДА) рассчитывают по формуле

$$K = (A_0 - A_k) / \epsilon,$$

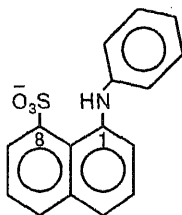
где K — количество продуктов ПОЛ; A_0 — оптическая плотность опытного раствора; A_k — оптическая плотность контрольного раствора; ϵ — молярный коэффициент экстинкции, равный в данном случае $1,56 \cdot 10^5$ моль⁻¹·см⁻¹.

Образование комплекса ТБК—МДА регистрируют также флуоресцентным методом. Для этого к 0,1 мл 3 %-ного раствора додецилсульфата натрия добавляют 1,5 мл 2 моль/л ацетатного буфера (pH 3,6) и 0,8 %-ного раствора ТБК, доводят бидистиллированной водой до 4 мл. Полученную смесь инкубируют при 95 °С в течение 60 мин. После охлаждения добавляют 1 мл 0,2 н соляной кислоты и 5 мл смеси н-бутанол-пиридин в объемном соотношении 15:1 и перемешивают. Центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин, отделяют надосадочную жидкость и регистрируют ее спектр флуоресценции в области длин волн 450—600 нм. Затем определяют интенсивность люминесценции в ее максимуме (≈ 515 нм). Чувствительность метода по стандарту МДА составляет 0,5 нмоль при использовании чистых образцов ТБК.

6.4. ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ СТРУКТУРНОГО СОСТОЯНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ

Современным биофизическим методом исследования, позволяющим изучать структурное состояние биомембран, транспорт ионов, трансмембранный потенциал, взаимодействие веществ различной природы с мембранами и другие процессы, признан метод флуоресцентных зондов.

“Универсальным” мембранным флуоресцентным зондом, реагирующим на самые разнообразные перестройки, которые могут происходить в мембранах, служит 1-анилинонафталин-8-сульфонат (АНС):



АНС был первым зондом, который использовал Д. Лоуренс в 1952 г. для исследования мембранных структур. Он является классическим примером зонда, распределяющегося между водной и мембранной фазами в измеримой пропорции. АНС флуоресцирует практически только в связанном с мембраной состоянии. При этом флуоресценция связанного с мембраной красителя заметно отличается по своим характеристикам от его флуоресценции в водной фазе, что позволяет делать заключение о характере микроокружения хромофорных групп молекул зонда.

Исследователя, использующего флуоресцентные зонды, интересуется положение максимумов их спектров поглощения и флуоресценции не только в связи с необходимостью выбора правильных условий возбуждения и измерения флуоресценции, но и потому, что величина стоксова сдвига (длинноволновый сдвиг максимума флуоресценции по отношению к максимуму поглощения) отражает такое важное свойство среды, как полярность. Величина стоксова сдвига определяется следующими условиями:

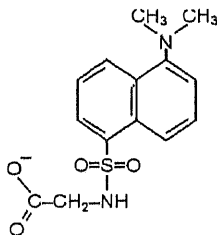
- а) изменением дипольного момента молекулы при переходе из основного в возбужденное состояние;
- б) электронной и ориентационной поляризуемостью окружающих зонд молекул.

Спектр поглощения АНС в водном растворе имеет максимум в области длин волн 350—360 нм, а спектр флуоресценции — при 478—480 нм.

При связывании данного красителя мембранами или белками в определенной мере изменяются все параметры поглощения и флуоресценции, так как зонд оказывается в среде менее полярной и менее текучей, чем водный раствор. При взаимодействии АНС с различными мембранами происходит изменение положения максимумов поглощения и флуоресценции, интенсивности и степени поляризации флуоресценции, анизотропии поляризованной флуоресценции. Эти изменения позволяют количественно оценить степень связывания зонда с мембранами. Вместе с тем следует учитывать и тот факт, что характеристики связавшегося зонда сильно зависят от состава исследуемых мембран (митохондриальных, фосфолипидных, плазматических). Еще более чувствительным параметром является интенсивность флуоресценции, так как она определяется еще и количеством связавшегося зонда.

Сейчас трудно однозначно ответить на вопрос о локализации АНС в белково-липидных мембранах. Предполагают, что молекула зонда не может глубоко погрузиться в липидный бислой, так как заряженная сульфогруппа должна оставаться на поверхности. Кроме того, горизонтальная ориентация длинной оси его молекулы не позволяет погрузить в бислой фенильное кольцо. Скорее всего, в плазматических мембранах часть АНС связана с белками, а часть — с липидами. В пользу этого представления приводят данные о двух компонентах кривой затухания флуоресценции АНС в белково-липидных мембранах, из которых компонента с большим временем жизни преимущественно обусловлена молекулами зонда, связанными с белками, а вторая — с липидами.

1-Диметиламино-5-нафталиносulфохлорид (DANS) способен ковалентно присоединяться к свободным аминогруппам и является хромофором многих флуоресцентных зондов. DANS-глицин имеет следующую структурную формулу:



Аминогруппа DANS-глицина, с одной стороны, сопряжена с π -электронной системой нафталина, а с другой — взаимодействует с растворителями, полностью изменяя как спектр поглощения нафталина, так и его флуоресцентные свойства. При возбуждении молекулы аминогруппа поворачивается в одну плоскость с кольцами нафталина, при этом дипольный момент молекулы увеличивается. Появляется большой Stokes'ов сдвиг спектра флуоресценции, сильно зависящий от полярности растворителя. Взаимодействие аминогруппы с протонодонорными растворителями (особенно водой) приводит к тушению флуоресценции, причем D_2O тушит флуоресценцию DANS в 2—3 раза слабее, чем H_2O . Если аминогруппа присоединяет протоны, то в процесс взаимодействия вступает электронная пара атома азота, ранее связанная с кольцом. В результате сопряжение исчезает, а вместе с ним — длинноволновая полоса поглощения и связанная с ней флуоресценция.

Предполагают, что возбужденная молекула DANS может находиться в двух различных состояниях, различающихся степенью чувствительности к полярности микроокружения.

Лабораторная работа № 12

Исследование фотоиндуцированных изменений структурного состояния эритроцитарных мембран методом флуоресцентных зондов

Материалы и оборудование: свежеприготовленные препараты мембран эритроцитов человека, 1-анилинонафталин-8-сульфонат, DANS-глицин, акридиновый желтый, флуоресцеин, NaOH, родамин 6Ж, акридиновый оранжевый, установка для регистрации спектров люминесценции.

Ход работы

Для регистрации спектров флуоресценции зондов 1,8-АНС и DANS-глицина в комплексе с нативными и УФ-облученными эритроцитарными мембранами необходимо использовать установку, описанную в работе В. Г. Артюхова, О. В. Путинцевой (1996). В ней в качестве источника света применяют ртутную лампу СВД-120. Возбуждающий свет выделяется с помощью светофильтра СЗС 7—2 и падает на кювету с исследуемым образцом. Люминесценцию растворов зондов измеряют при помощи многоходовой кварцевой кюветы объемом 4 мл с зеркальными стенка-

ми. Регистрируемый свет проходит через монохроматор спектрофотометра СФ-4А и фиксируется фотоумножителем ФУЭ-18А. Напряжение на ФЭУ составляет 1 кВ. Ширина щели — 1 мм. Сигнал с ФЭУ через входной блок подается на вход программируемого цифрового вольтметра В 7-43 и обрабатывается по встроенной программе Р4 (“среднее арифметическое из n измерений”). С целью проверки правильности работы прибора проводят его калибровку по стандартным растворам красителей: акридинового желтого, флуоресцеина в 0,1 н растворе NaOH, родамина 6 Ж, акридинового оранжевого.

Для работы необходимо приготовить раствор АНС (препарат фирмы “Sigma”, США) на бидистиллированной воде, имеющий исходную концентрацию $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л, и спиртовой раствор DANS-глицина (содержание спирта — не более 10 %) с исходной концентрацией 10^{-4} моль/л.

Для исследования спектров флуоресценции 1,8-АНС в комплексе с суспензией нативных и УФ-облученных мембран указанные растворы в объеме 1,5 мл надо проинкубировать с 1,5 мл $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л водного раствора АНС при 20 °С в течение 15 мин, затем смесь внести в кювету и зарегистрировать спектр флуоресценции в интервале длин волн 430—500 нм.

Для изучения спектров флуоресценции зонда DANS-глицина в комплексе с суспензией нативных и УФ-модифицированных мембран эритроцитов указанные растворы в объеме 1 мл необходимо смешать с 0,5 мл раствора зонда и 1,5 мл 10 ммоль/л трис-HCl буфера (рН 7,6 при 20 °С) и инкубировать смесь в течение 15 мин, затем регистрировать спектры флуоресценции в интервале длин волн 500—550 нм.

I вариант

Предварительно зарегистрировать спектры поглощения и флуоресценции водного раствора зонда 1,8-АНС (контроль). Затем снять спектры люминесценции зонда в присутствии суспензии эритроцитарных мембран с учетом эффекта разведения. Полученные данные изобразить графически, откладывая по оси абсцисс длину волны измеряемого света, а по оси ординат — интенсивность флуоресценции опытных образцов. Сделать вывод о характере изменений люминесцентных свойств 1,8-АНС в присутствии мембранного препарата.

Провести УФ-облучение эритроцитарных мембран согласно методике, описанной в лабораторной работе № 5, в дозах 0,76;

1,51; 3,02; 2,26; 4,53 кДж/м² и зарегистрировать спектры флуоресценции зонда в присутствии модифицированных мембран. Построить график зависимости средних значений интенсивности флуоресценции АНС в его максимуме в присутствии нативных и УФ-облученных мембран от дозы УФ-света. Сделать вывод о причинах изменений люминесцентных характеристик АНС в комплексе с модифицированными мембранами, индуцированных воздействием УФ-излучения в широком диапазоне длин волн, а также о характере структурных нарушений облученных эритроцитарных мембран.

II вариант

В качестве зонда использовать DАNS-глицин, все операции проводить аналогично описанным в варианте I этой работы.

6.5. ИССЛЕДОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАН К ДЕЙСТВИЮ РАЗЛИЧНЫХ ХИМИЧЕСКИХ АГЕНТОВ ПРИ ПОМОЩИ МЕТОДА РЕГИСТРАЦИИ ОСМОТИЧЕСКИХ И КИСЛОТНЫХ ЭРИТРОГРАММ*

Осмотическая резистентность клеточных популяций крови является важным показателем, характеризующим проницаемость эритроцитарных мембран, белок-липидные взаимодействия в мембране, состояние белковых структур цитоскелета клетки.

Гемолиз эритроцитов под действием гемолитиков осуществляется через ряд последовательных стадий: предгемолитическую, стадию осмотического и химического гемоглобинолиза, строматопороза и строматолиза. Главными показателями предгемолитической стадии являются выход ионов калия в окружающую среду и сферуляция эритроцитов. Протекание гемоглобинолиза зависит от физико-химических свойств гемолитика. Так, при осмотическом гемоглобинолизе набухание эритроцитов до критического уровня приводит к повреждению мембраны, в результате чего свободная фракция внутриклеточного гемоглобина диффундирует наружу. Осмотический тип гемолиза не сопровождается химическими изменениями состава эритроцитов, сохраняются также и его электрические свойства. Так как осмотический гемолиз вызывает только частичный выход гемоглобина, то из этого следует, что часть гемоглобина находится в связанной со

* Раздел написан С. Г. Резваном.

стромой форме в виде гемолипостроматинового комплекса (соединение гемоглобина с липидами и холестерином). Реализация процесса освобождения связанной фракции происходит в стадии химического гемоглобинолиза, осуществляющейся под действием поверхностно-активных веществ (сапонин, дигитонин и др.). При этом наблюдается выход связанного гемоглобина вследствие распада гемолипостроматинового комплекса.

Все вышеперечисленные стадии протекают без нарушения морфологической целостности эритроцита. Стадия строматопо-роза, характеризующаяся проводимостью эритроцитами электрического тока при сохранении морфологической целостности клетки, наступает при действии на эритроциты концентрированных растворов сапони-на.

Полная дезинтеграция структуры клетки (строматолиз) происходит под влиянием холево-, дезоксихолево- и олеиновокислого натрия.

Принцип метода регистрации осмотических и кислотных эритрограмм заключается в фотометрической регистрации кинетики распада эритроцитов под действием гемолитика в определенной дозе. Мерой стойкости эритроцитов является время, в течение которого происходит их разрушение. Многостадийный процесс вовлечения эритроцитов в гемолиз позволяет построить эритрограмму — зависимость их распределения по стойкости во времени.

Лабораторная работа № 13

Автоматический метод регистрации осмотических и кислотных эритрограмм

Установка для регистрации эритрограмм, разработанная С. Г. Резваном на кафедре биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета, позволяет измерять степень повреждения мембран эритроцитов по действию различных химических агентов. Оптический блок установки состоит из фотоэлектрического колориметра ФЭК-56 М со встроенным дифференциальным усилителем. Регистрационный блок представлен двухкоординатным регистратором ЛКД 4-003, цифровым вольтметром В7-20. Для термостатирования суспензии эритроцитов применяют ультратермостат УТУ-6 и термостатируемые кюветы. Электрическая схема предварительного усилителя позволяет получить линейную зависимость между истинным коэффи-

циентом светопропускания (T) и выходным сигналом установки.

Гемолиз эритроцитов проводят в кюветах с наружными размерами $20 \times 40 \times 10$ мм и рабочим объемом 4 мл. Точность хода луча ФЭКа составляет 0,01 мм. Для увеличения точности хода лучей ограничивают диаметр центрального окна кюветы до 0,8 см. Чувствительность ФЭКа при этом уменьшается, но результаты становятся более стабильными за счет уменьшения вклада светорассеяния. Измерение светопропускания проводят при длине волны 490 нм, так как в данном случае коэффициент молярной экстинкции оксигемоглобина минимален. Следовательно, при использовании этого метода регистрации тестируется не сам гемолиз (выход гемоглобина в среду инкубирования), а повреждение мембран эритроцитов: светорассеяние исследуемых образцов изменяется за счет разрушения мембраны, в том числе ее цитоскелета. Выход гемоглобина — явление вторичное и при длине волны 490 нм практически не влияет на регистрируемый сигнал.

При проведении гемолиза эритроцитов в одной кювете установка регистрирует S-образную интегральную кривую, форма которой отражает суммарное изменение величины светорассеяния (τ) в исследуемом растворе во времени, т. е. $\tau = f(t)$ — рис. 61. В процессе гемолиза скорость распада эритроцитов достигает максимального значения примерно в середине кривой. При дифференцировании сигнала интегральной кривой, т.е. зависимости dT/dt , в области максимальной скорости гемолиза эритроцитов

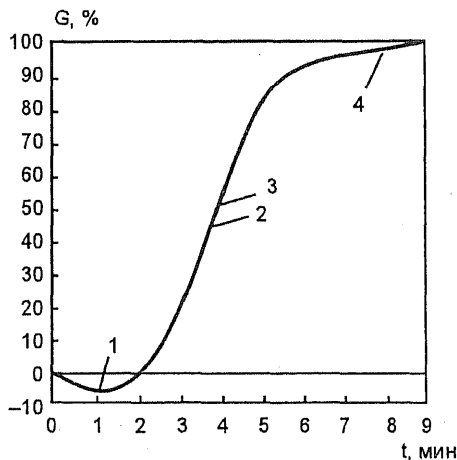


Рис. 61. Интегральная кривая осмотического (кислотного) гемолиза эритроцитов: 1 — фаза сферуляции; 2 — максимальная скорость гемолиза ($v_{\max}$); 3 — время 50 % гемолиза (t_{50}); 4 — конечная фаза гемолиза. По оси абсцисс — время гемолиза; по оси ординат — степень гемолиза эритроцитов

появляется глобальный максимум. Кинетический метод регистрации процесса разрушения эритроцитов позволяет оценивать следующие параметры:

$t_{\text{лат}}$ — время латентного периода гемолиза, с;

t_{G} — собственное время гемолиза;

t_{50} — время половинного гемолиза, с;

v_{max} — максимальная скорость гемолиза, отн. ед.;

G_{sf} , G — степень сферуляции и гемолиза эритроцитов, %.

Латентный период ($t_{\text{лат}}$) отражает время, прошедшее с момента введения гемолитика в кювету до первого появления гемоглобина вне эритроцита (участок “0—1” на рис. 61). Смещение интегральной кривой вниз от нулевой линии вызвано повышением интенсивности рассеяния света суспензией эритроцитов в результате их сферуляции. Истинный гемолиз, отраженный в виде S-кривой, представляет собой процесс последовательного вовлечения всей массы эритроцитов (участок “1—4”); в первое время происходит разрушение самых старых эритроцитов, являющихся наименее стойкими (участок “1—2”). Появление изгиба на интегральной кривой перед выходом на плато (участок “3—4”) характеризует кинетику разрушения молодых, наиболее стойких эритроцитов. Плато на кривой (точка “4”) означает, что гемолиз окончен, т.е. все эритроциты гемолизированы.

Линейный участок S-образной кривой отражает кинетику распада основной массы эритроцитов. Но и в этой фракции есть группа клеток, гемолиз которых происходит со скоростью, превышающей скорость распада любой другой группы данной популяции эритроцитов. Точка “2”, расположенная примерно в середине кривой, соответствует времени распада эритроцитов, происходящего с максимальной скоростью (v_{max}). Она соответствует положению максимума дифференциальной кривой.

Промежуток времени до начала разрушения самых нестойких клеток (точка “1”) до конца процесса (точка “4”) представляет собственное время гемолиза. Время, прошедшее с момента введения гемолитика в кювету до выхода кривой на плато, — общее время гемолиза. Иногда удобнее пользоваться временем половинного гемолиза t_{50} (точка “3”). Это время, за которое происходит распад 50 % эритроцитов. При исследовании кинетики гемолиза эритроцитов, индуцированного действием химических агентов, используются гипоосмотические растворы этих соединений с различной концентрацией в 0,55 % NaCl.

6.6. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИПИДНОГО СОСТАВА ЭРИТРОЦИТОВ

При изучении биомембран обычно имеют дело с относительно небольшими количествами липидов, поэтому для их разделения чаще всего используют метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) на силикагеле, позволяющий проводить и качественный, и количественный анализ липидов различных классов. ТСХ осуществляют в тонком слое силикагеля, нанесенном на подложку — стеклянную, пластиковую или алюминиевую пластинку. В качестве адсорбентов можно применять и другие вещества (оксид алюминия, сефарозу, целлюлозу). Силикагель может быть с кальциевой связующей добавкой (силикагель G) или без нее (силикагель H). Для разделения липидов используют хроматографические камеры, стенки которых выстилают изнутри фильтровальной бумагой для ускорения насыщения ее парами растворителя. Камеру готовят предварительно (примерно за 1 ч или более до эксперимента), залив в нее достаточное количество растворителя на глубину около 1,5 см. Фильтровальная бумага, выстилающая стенки камеры, должна пропитаться растворителем. Необходимо плотно закрывать камеру крышкой (если необходимо — использовать вазелиновую смазку). В камеру обычно помещают одновременно не более двух пластинок так, чтобы поверхность подложки была обращена в сторону выстилающей камеру бумаги, а слой адсорбента находились на максимальном удалении друг от друга. Слой адсорбента не должен соприкасаться с боковыми стенками камеры.

Для лучшего разделения липидов рекомендуют активировать хроматографические пластинки, прогрев их при 110 °С в течение 30 мин. Исследуемые образцы в полярном растворителе наносят на расстоянии около 2,5 см от края пластинки в виде полос или пятен при помощи микропипетки с тонким наконечником. Прежде чем начинать разделение, необходимо убедиться, что растворитель полностью испарился из нанесенных образцов. Уровень растворителя в камере должен быть примерно на 1 см ниже уровня нанесенных образцов. Разделение заканчивают, когда фронт растворителя доходит до уровня на 1—2 см ниже верхнего края пластины. Последнюю вынимают из камеры, осторожно отмечают карандашом фронт растворителя и высушивают в вытяжном шкафу.

При разделении смеси липидов сложного состава проводят двумерную хроматографию с использованием двух систем растворителей. Для этого образец наносят в одном углу пластинки и проводят разделение в первой системе растворителей, причем пятна липидов располагаются вдоль одного края пластинки. Ее высушивают, поворачивают на 90° (пятна должны располагаться внизу) и проводят разделение во второй системе растворителей. Все классы липидов нельзя разделить в одной системе растворителей. Поэтому выбирают систему растворителей для разделения определенного класса липидов. В случае полного анализа липидов используют несколько систем растворителей.

Лабораторная работа № 14

Определение фосфолипидов эритроцитарных мембран методом тонкослойной хроматографии

Материалы и оборудование: хлороформ, метанол, бензол, силикагель КСК или Н, стеклянные пластинки 6×6 см (9×12 см), активированный гипс (или карбонат натрия). 25 %-ный водный раствор аммиака, ацетон, ледяная уксусная кислота, серная кислота, бутанол, вингидрин, раствор Драгендорфа, 42%-ная хлорная кислота, молибдат аммония, аскорбиновая кислота, кровь доноров, стеклянные пробирки, пипетки, центрифуга, роторный испаритель, хроматографическая камера, шаровая мельница, водяная баня, фотоэлектроколориметр КФК-3.

Ход работы

Получить хорошо отмые эритроциты по методике, описанной в лабораторной работе № 1. 5 мл отмых эритроцитов обработать 15 мл смеси хлороформ-метанол (1:2). Смесь перемешать стеклянной палочкой и оставить в холодильнике на 10—12 ч, затем отцентрифугировать при 5000 об/мин и отделить супернатант и поместить его в холодильник. Осадок реэкстрагировать 19 мл смеси хлороформ—метанол—вода (1:2:0,8) и снова центрифугировать при тех же условиях. Супернатанты, полученные в результате двух экстракций, разбавить 10 мл хлороформа и 10 мл воды. В результате образуется двухфазная система, нижний слой которой состоит из хлороформа с растворенными в нем липидами, свободными от загрязнений, а верхний — из смеси метанола и воды, содержащий водорастворимые нелипидные примеси. Отделить хлороформную фракцию, разбавить ее равным

по объему количеством бензола и упарить на ротаторном испарителе или под тягой на водяной бане при 40—50 °С. Липиды взвесить и растворить в нужном объеме хлороформа для получения концентрации 10 мг/мл.

Для приготовления силикагеля 220 г силикагеля КСК, размолотого на шаровой мельнице, залить 2 л дистиллированной воды, тщательно размешать и оставить для осаждения на 40 мин. Затем надосадочную жидкость слить в другой стакан и довести водой объем до 2 л. Осадок, накопившийся в течение 2 ч, перемешать в минимальном количестве воды и оставить на ночь. Перед использованием к осадку добавить равное по объему количество воды для приготовления рабочей суспензии. При использовании силикагеля Н 1,5 г носителя размешивают в 5 мл раствора безводного карбоната натрия (6,8 мг на 100 мл воды).

Для анализа фосфолипидов используют стеклянные пластинки размером 6×6 (9×12) см с закрепленным слоем силикагеля. Для этого к 25 мл 50 %-ной суспензии силикагеля добавить 80 мг просеянного и активированного гипса. 1 мл тщательно перемешанной смеси нанести на предварительно обезжиренную стеклянную пластинку и оставить влажную пластинку для высыхания на горизонтальной поверхности. Пластинки можно хранить в эксикаторе над безводным хлористым кальцием.

Раствор 100 мкг липидной фракции в 10 мкл хлороформа нанести микрошприцем в угол пластинки на расстоянии 1 см от края. Предварительно хроматографическая камера должна быть насыщена парами растворителей в течение 20—30 мин. Хроматографию проводят сначала в вертикальном направлении в системе 1 (хлороформ—метанол—25 %-ный водный раствор аммиака в соотношении 13:7:1) до момента достижения верхнего края пластинки фронтом растворителей. После извлечения из камеры и просушивания пластинку поместить в другую камеру с системой 2 (хлороформ—ацетон—метанол—ледяная уксусная кислота—вода в соотношении 10:4:2:2:1) и хроматографировать липиды в перпендикулярном направлении. Затем необходимо высушить пластинку, опрыснуть 10 %-ной серной кислотой в метаноле и проявить в течение 20 мин при 180 °С. В результате хроматографического разделения каждый фосфолипид занимает определенное место в виде пятна на пластинке (рис. 62). Индивидуальные пятна фосфолипидов идентифицируют с помощью цветных реакций. Фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин опре-

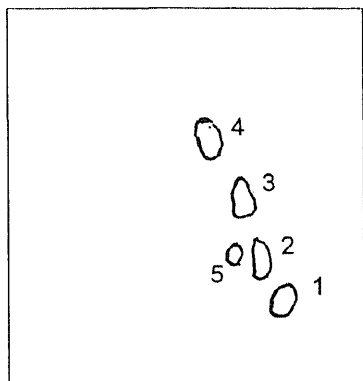


Рис. 62. Расположение индивидуальных фосфолипидов после проведения двумерной хроматографии в тонком слое силикагеля (Н. Ю. Кальнова, 1992): 1 — лизофосфатидилхолин; 2 — сфингомиелин; 3 — фосфатидилхолин; 4 — фосфатидилэтанол-амин; 5 — фосфатидилсерин

деляют с помощью нингидрина. Для этого высушенные хроматограммы опрыскивают раствором нингидрина (0,3 моль/л) в бутаноле; после высушивания и нагревания пятна, соответствующие этим липидам, окрашиваются в розовый цвет. Для обнаружения холинсодержащих фосфолипидов пластинки опрыскивают раствором Драгендорфа. При этом пятна, содержащие фосфатидилхолин, сфингомиелин и лизофосфатидилхолин, окрашиваются в ярко-розовый цвет.

Содержание фосфолипидов определяют по уровню неорганического фосфата по калибровочной прямой, полученной при помощи однозамещенного фосфорнокислого калия согласно методике, описанной в лабораторной работе № 8. Предварительно после высушивания на воздухе пластинок их проявляют в парах йода. Затем пятна быстро и аккуратно “обкалывают” иглой, потом снимают специальной лопаточкой и переносят в пробирки. В каждую пробирку добавляют 0,1 мл 42 %-ной хлорной кислоты, нагревают при высокой температуре до обесцвечивания силикагеля и испарения кислоты. После охлаждения добавляют 0,49 мл хлорной кислоты, 0,81 мл воды, 0,4 мл 1,25 %-ного раствора молибдата аммония и 0,4 мл 5 %-ной аскорбиновой кислоты, выдерживают в кипящей водяной бане в течение 5 мин и фотографируют.

6.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ КРОВИ*

Лабораторная работа № 15

Исследование каталитической активности супероксиддисмутазы в эритроцитах крови доноров

Супероксиддисмутаза (СОД) осуществляет защитную реакцию в отношении супероксидного радикала кислорода, катализируя реакцию дисмутации $O_2^{\cdot -}$ с образованием пероксида водорода (см. раздел 3.1). В организме человека СОД найдена практически во всех органах и тканях; наиболее высокий уровень фермента обнаружен в эритроцитах, мозге, печени, щитовидной железе.

Молекула СОД состоит из двух идентичных субъединиц с молекулярной массой 16300 Да, связанных между собой дисульфидной связью.

СОД является одним из быстродействующих ферментов: константа скорости реакции ферментативной дисмутации анион-радикалов составляет $2 \cdot 10^9$ моль⁻¹ · л⁻¹.

СОД как один из основных ферментов антиоксидантной системы организма участвует не только в регуляции уровня высоко-реакционноспособных супероксидных анион-радикалов, но и контролирует концентрацию продуктов ПОЛ на стадии инициирования цепей окисления.

Активная генерация $O_2^{\cdot -}$ при воспалительных процессах сопряжена с мобилизацией антиоксидантной системы, приводящей к индукции синтеза СОД. При увеличении длительности токсического воздействия кислорода наблюдается истощение системы антиокислительной защиты организма, повышается скорость реакций ПОЛ.

Применение лекарственных форм СОД или СОД-активных соединений позволяет снижать концентрацию $O_2^{\cdot -}$. Таким образом, состояние антиоксидантной защиты и, в частности, уровень СОД, отражает компенсаторные возможности организма при различных состояниях, связанных со свободнорадикальной патологией.

Материалы и оборудование: кровь доноров, хлорид натрия, хлороформ, этанол, 0,01 моль/л Na-фосфатный буфер (рН 8,5),

* Раздел написан с участием О. В. Башариной.

этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА), тетраметилэтилендиамин (ТЭМЭД), нитросиний тетразолиевый (НСТ), рибофлавин, калий йодистый, центрифуга МРВ-340, центрифужные весы, спектрофотометр СФ-46, кварцевые кюветы для спектрофотометра, стеклянные пипетки, пробирки, фильтровальная бумага.

Ход работы

Метод определения активности СОД основан на ее способности конкурировать с красителем нитросиним тетразолиевым за супероксидные анион-радикалы, образующиеся при генерации их в системе тетраметилэтилендиамин—рибофлавин. В ходе реакции НСТ восстанавливается с образованием гидразинтетразолия, характеризующегося максимумом поглощения при 540 нм. В присутствии СОД степень восстановления НСТ уменьшается.

Выделить эритроциты из крови доноров согласно методике, описанной в лабораторной работе №1. 500 мкл эритроцитов гемолизировать на холоде с равным объемом дистиллированной воды. Для удаления гемоглобина эритроциты обработать 400 мкл хлороформ-этаноловой смеси (3:5), добавить 100 мкл воды и оставить на 30 мин при +4 °С. Гемолизат центрифугировать при 4000 об/мин в течение 10 мин, отобрать 50 мкл супернатанта и смешать с 600 мкл дистиллированной воды.

Реакционная смесь содержит:

1. Фосфатный буфер — 0,5 мл;
2. ТЭМЭД (0,05 моль/л) в 0,2 моль/л ЭДТА — 0,5 мл;
3. НСТ (0,85 ммоль/л) — 0,5 мл;
4. Вода дистиллированная — 2,5 мл;
5. Раствор, содержащий СОД, — 50 мкл;
6. Рибофлавин (0,034 ммоль/л) — 1 мл.

В контрольную пробу раствор фермента не добавлять. Реакция инициируется облучением лампой дневного свет (мощность 20 Вт) на расстоянии 20 см в течение 5 мин. Для остановки реакции прилить 0,5 мл раствора КЖ (1 %). Оптическую плотность зарегистрировать на спектрофотометре СФ-46 при 540 нм. За единицу активности фермента принимают такое его количество, которое обеспечивает ингибирование восстановления нитросинего тетразолиевого на 50 %. Активность СОД рассчитывают по формуле

$$A = (K - O) / K \cdot 100 \%,$$

где А — активность фермента в усл. единицах; К — оптическая плотность контрольной пробы; О — оптическая плотность опытной пробы.

Лабораторная работа № 16

Определение активности каталазы в эритроцитах крови человека спектрофотометрическим методом

Каталаза (пероксид водорода: пероксид водорода — оксидоредуктаза, 1.11.1.6) разрушает пероксид водорода, образующийся прямым путем при восстановлении кислорода или более сложным путем при дисмутации супероксидных радикалов. Этот фермент катализирует двухэлектронное восстановление H_2O_2 до H_2O , используя H_2O_2 как донор электрона. Каталаза в клетке локализована в микротельцах (пероксисомах), входит в состав лизосом.

Молекулярная масса каталазы из различных источников составляет 225—251 кДа. Молекула каталазы состоит из 4 идентичных субъединиц и 4 групп гематина.

Следует отметить, что каталаза проявляет и умеренную пероксидазную активность, т.е. катализирует реакцию окисления органических веществ пероксидом водорода.

Считают, что каталаза всегда присутствует в биосистемах, где происходят процессы клеточного дыхания с участием цитохромов, т.е. там, где в результате восстановления кислорода образуется пероксид водорода, который весьма токсичен для живой клетки и поэтому должен быть удален.

В связи с тем, что каталаза локализуется преимущественно в печени и эритроцитах, целесообразно определять ее активность в сыворотке крови при заболеваниях печени и гемолитических процессах.

Материалы и оборудование: кровь доноров, хлорид натрия, хлороформ, этанол, 0,01 моль/л Na-фосфатный буфер (рН 6,7), этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА), пероксид водорода, 10 %-ный раствор серной кислоты, центрифуга МРВ-340, центрифужные весы, спектрофотометр СФ-46, кварцевые кюветы для спектрофотометра, стеклянные пипетки, пробирки, фильтровальная бумага.

Работа включает 3 этапа (а, б, в).

а) Получение эритроцитов

Эритроциты получают из цельной крови человека путем центрифугирования на центрифуге МРВ-340 при 1500 об/мин

в течение 15 мин. Сыворотку отбирают с помощью пастеровской пипетки, добавляют к эритроцитам равный объем 0,9 %-ного раствора NaCl и повторно центрифугируют в том же режиме. Эритроциты отмывают таким способом в растворе NaCl 3 раза. Затем 2 мл эритроцитов разводят 0,9 %-ным раствором NaCl в соотношении 1:1000 до значений оптической плотности $D=0,7$ при 410 нм, что соответствует концентрации $1,5 \cdot 10^8$ кл/мл.

б) Получение гемолизата эритроцитов, свободного от гемоглобина

К 0,5 мл эритроцитов добавляют 0,5 мл бидистиллированной воды для нарушения целостности эритроцитарных мембран и оставляют на холоде в течение 15—20 мин.

Гемоглобин осаждают хлороформ-этаноловой смесью (1:5). Для этого к 1 мл гемолизата добавляют 200 мкл хлороформ-этаноловой смеси. Затем гемолизат центрифугируют в течение 10 мин при 3000 об/мин. Отбирают супернатант и в нем определяют активность каталазы, предварительно разбавив его бидистиллированной водой в соотношении 1:10.

в) Определение функциональной активности каталазы

Принцип метода. Определение активности каталазы основано на ее способности высокоэффективно катализировать реакцию разложения пероксида водорода на воду и кислород.

Реакционная смесь содержит следующие растворы:

1. Фосфатный буфер (0,01 моль/л), рН 6,7 — 0,5 мл.
2. Этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА) (10^{-4} моль/л) — 0,5 мл.
3. Пероксид водорода (0,015 моль/л) — 2 мл.
4. Исследуемый образец — 0,1 мл.

Для определения активности каталазы в контрольную и опытную пробы, содержащие исследуемый ферментный раствор, добавляют фосфатный буфер, пероксид водорода и ЭДТА. Пробирки оставляют на 10 мин при комнатной температуре, предварительно остановив реакцию в контрольной пробе добавлением 1 мл 10 %-ного раствора серной кислоты. Такой же объем серной кислоты добавляют в опытную пробу после окончания инкубации. Каталазную активность определяют на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 250 нм.

Холостая проба для учета спонтанной реакции разложения пероксида водорода отличается тем, что вместо образца, содержащего каталазу, в нее добавляют такой же объем фосфатного буфера.

За единицу активности (А) принимают такое количество (в молях) пероксида водорода, которое разложилось при инкубации в единицу времени:

$$A = \frac{\Delta D \cdot V_1 \cdot c_1 \cdot n}{D_x \cdot V_2 \cdot c_2 \cdot t} \quad (\text{моль/мин на 1 мг белка}),$$

где ΔD — разность оптических плотностей опытной и контрольной проб; D_x — оптическая плотность холостой пробы; V_1 — общий объем инкубационной смеси; V_2 — объем исследуемого образца; c_1 — концентрация H_2O_2 ; c_2 — концентрация белка в пробе; n — фактор разведения; t — время инкубации.

Лабораторная работа № 17

Исследование функциональной активности глутатионредуктазы эритроцитов

Глутатионредуктаза (NAD(P)H: окисленный глутатион-оксидоредуктаза), фермент класса оксидоредуктаз, катализирующий восстановление окисленного глутатиона:



где GS — остаток глутатиона; NADPH и $NADP^+$ — соответственно восстановленные и окисленные формы кофермента никотинамидадениндинуклеотидфосфата.

Глутатионредуктаза состоит из двух одинаковых субъединиц с молекулярной массой каждой 50—55 тысяч: полость между ними в ходе реакции занимает глутатион. Субъединицы содержат по 4 структурных домена, на одном конце которого расположен остаток флавинадениндинуклеотида, на другом NAD(P)H-связывающие участки. Наиболее полно изучено строение глутатионредуктазы эритроцитов человека, субъединица которой состоит из 478 аминокислотных остатков и содержит по 30 % α -спиралей и β -структур.

Активность глутатионредуктазы в сыворотке крови повышается при инфаркте миокарда, онкологических заболеваниях и гепатитах, а в эритроцитах — при наследственной недостаточности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, что позволяет использовать определение уровня глутатионредуктазы в диагностических целях.

Материалы и оборудование: кровь доноров, хлорид натрия, хлороформ, этанол, 0,067 моль/л Na-фосфатный буфер (pH 6,6), окисленный глутатион, NADPH, центрифуга MPW-340, центрифужные весы, спектрофотометр СФ-46, кварцевые кюветы для

спектрофотометра, стеклянные пипетки, пробирки, фильтровальная бумага.

Ход работы

Получить отмытые эритроциты по методике, описанной в лабораторной работе № 1. 0,5 мл эритроцитарной массы гемолизировать с 10 мл 0,067 моль/л фосфатного буфера (рН 6,6) и оставить на холоде 15 мин.

С целью осаждения гемоглобина к 1 мл гемолизата добавить 0,2 мл хлороформ-этаноловой смеси (1:5), тщательно перемешать, выдержать на холоде 5 мин и центрифугировать при 5000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант использовать для определения активности глутатионредуктазы.

0,1 мл супернатанта добавить в спектрофотометрическую кювету, содержащую 2,9 мл 0,067 моль/л фосфатного буфера (рН 6,6) с 0,027 ммоль/л окисленного глутатиона и 0,02 ммоль/л NADPH. Оптическую плотность раствора измерить при длине волны 340 нм на спектрофотометре СФ-46 сразу после добавления супернатанта и через 5 мин после инкубации реакционной смеси. Активность глутатионредуктазы (А) рассчитывают по формуле

$$A = \frac{\Delta D_{340} \cdot V_{\text{пр}} \cdot q}{\epsilon \cdot l \cdot V_{\text{супер}} \cdot t},$$

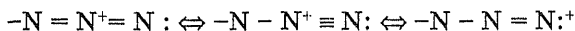
где $\Delta D_{340} = D_1 - D_2$ — изменение величины оптической плотности реакционной смеси за 5 мин; $V_{\text{пр}}$ — конечный объем пробы (3 мл); q — фактор разведения эритроцитов; ϵ — молярный коэффициент поглощающего соединения (NADPH), равный $6,2 \cdot 10^3$ л (моль⁻¹·см⁻¹); l — длина оптического пути, см; $V_{\text{супер}}$ — объем добавленного супернатанта (0,3 мл); t — время инкубации реакционной смеси (5 мин).

Каталитическую активность глутатионредуктазы выражают в мкмольх превращенного NADPH в 1 мин на 1 мл эритроцитов.

6.8. ИЗУЧЕНИЕ УЧАСТИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ПРОЦЕССАХ УФ-МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ

Для выявления участия активных форм кислорода в процессах фотомодификации белковых молекул проводят модельные эксперименты с использованием растворов биополимеров (в частности, лактатдегидрогеназы), а также акцепторов и тушителей активных кислородных метаболитов.

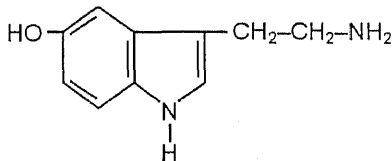
Одним из распространенных тушителей синглетного молекулярного кислорода является азид натрия NaN_3 . Это соединение обладает широким спектром действия, что обусловлено электронной конфигурацией его молекул. Группа $-\text{N}_3$ линейна:



Ее строение представляет собой суперпозицию трех резонансных структур с частичными зарядами у различных атомов азота. Вероятно, это способствует взаимодействию иона азида с комплементарными участками аминокислотных остатков белковой глобулы. Азид натрия используется как эффективный ионофор, его органические производные применяют в химической энзимологии в качестве фотореактивируемых поперечносшивающих агентов.

D-маннит — широко распространенное в природе вещество — обладает сродством к ОН-радикалам. Кроме того, его фотопротекторное действие может быть связано с образованием комплекса белок—спирт, более резистентного, чем свободный биополимер.

Серотонин (5-гидрокситриптамин) является биологически активным веществом из группы индолилалкиламинов:



Он принимает участие в различных физиологических процессах. Его рассматривают как химический медиатор нервных возбуждений, антидиуретический гормон, гемостатический агент, фактор роста, медиатор аллергических реакций и др. Установлено, что серотонин проявляет выраженный фотопротекторный эффект по отношению к молекулам гемопротеидов (феррицитохрома С, каталазы и оксигемоглобина). По всей вероятности, защитное действие этого биогенного амина может быть обусловлено как конкуренцией его молекул за активные частицы (первичные и пероксидные радикалы) УФ-фотолиза водных растворов белков, так и образованием комплекса серотонин — биополимер, более резистентного по сравнению со свободным белком.

Лактатдегидрогеназа — гликолитический фермент, катализирующий обратимую реакцию окисления молочной кислоты с

образованием пировиноградной кислоты в присутствии кофермента NAD (см. раздел 4.3).

ЛДГ обнаруживается во всех клетках и биологических жидкостях. Следует обратить внимание на тот факт, что уровень фермента в эритроцитах в 100 раз выше, чем в сыворотке. Поэтому при определении его активности в сыворотке крови гемолиз эритроцитов должен быть полностью исключен. Также необходимо быстро отделять сгусток от сыворотки. Активность ЛДГ могут подавлять гепарин и оксалат.

Повышение активности ЛДГ имеет место при некрозе тканей, особенно при остром поражении сердца, повреждении эритроцитов, почек, скелетных мышц, печени, легких и кожи. Значительное увеличение активности фермента сопровождается гемолитическими анемиями, связанные с дефицитом витамина B_{12} и фолиевой кислоты, а также эритремию. Возрастание уровня ЛДГ характерно для острой фазы инфекционного гепатита.

Определение изоферментного спектра ЛДГ также используют в диагностических целях. Изоферменты сывороточной ЛДГ выявляются после электрофореза при pH 8,6 на крахмальном, агаровом или полиакриламидном гелях. При инфаркте миокарда обнаруживается увеличение содержания ЛДГ 1. Относительное повышение уровня ЛДГ 4 и 5 наблюдается при остром гепатите, тяжелом мышечном повреждении, дерматомиозите, мышечной дистрофии.

Лабораторная работа № 18

Исследование каталитической активности лактатдегидрогеназы спектрофотометрическим методом

Принцип метода. В основе данного определения функциональной активности ЛДГ лежит метод Берг-Мейера, сущность которого заключается в оценке скорости окисления NADH, регистрируемой спектрофотометрически при длине волны 340 нм.

Материалы и оборудование: 0,1 моль/л Na-фосфатный буфер (pH 7,4), пируват натрия, буферный раствор лактатдегидрогеназы из сердца свиньи или скелетных мышц свиньи, спектрофотометр СФ-46, кварцевые кюветы, стеклянные пипетки и пробирки, фильтровальная бумага, секундомер.

Ход работы

Если в работе используется коммерческий препарат ЛДГ из мышц свиньи (кристаллическая суспензия в 2,2 моль/л сульфате аммония), то он должен быть предварительно обессолен методом гель-хроматографии на колонке (15×1,5 см), упакованной сефадексом G-25. Выделение ЛДГ из сердца свиньи проводят по методике, описанной в лабораторной работе № 17.

Концентрацию растворов фермента определяют на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 280 нм с использованием коэффициента молярной экстинкции $1,96 \cdot 10^5$ л (моль⁻¹ · см⁻¹) для мышечной и $0,196 \cdot 10^5$ л (моль⁻¹ · см⁻¹) для сердечной изоформы.

Реактивы (указаны конечные концентрации)

а) для ЛДГ из мышц свиньи:

1. На-фосфатный буфер — 0,1 моль/л (рН 7,4).
2. ЛДГ (буферный раствор) — 10^{-8} моль/л.
3. Пируват натрия (буферный раствор) — $1,5 \cdot 10^{-3}$ моль/л.
4. NADH (буферный раствор) — $5,4 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

б) для ЛДГ из сердца свиньи:

1. На-фосфатный буфер — 0,1 моль/л (рН 7,4).
2. ЛДГ (буферный раствор) — 10^{-8} моль/л.
3. Пируват натрия (буферный раствор) — $0,15 \cdot 10^{-3}$ моль/л.
4. NADH (буферный раствор) — $5,4 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

В кварцевую кювету для спектрофотометра поместить 2,8 мл раствора фермента и 0,1 мл NADH. На спектрофотометре СФ-46 при длине волны 340 нм измерить оптическую плотность D_1 . Затем в кювету прилить 0,1 мл пирувата натрия и через 30 с зарегистрировать оптическую плотность D_2 . Каталитическую активность ЛДГ (А) рассчитывают по формуле

$$A = \frac{\Delta D_{340} \cdot V_{\text{пр}}}{\epsilon \cdot l \cdot t},$$

где $\Delta D_{340} = D_1 - D_2$ — изменение величины оптической плотности реакционной смеси при 340 нм; ϵ — молярный коэффициент поглощающего соединения (NADH), равный $6,22 \cdot 10^3$ л (моль⁻¹ · см⁻¹); l — длина оптического пути (1 см); t — время инкубации реакционной смеси (30 с); $V_{\text{пр}}$ — конечный объем реакционной смеси (3 мл). Активность ЛДГ выражают в микромолях превращенного NADH в минуту.

Лабораторная работа № 19

Выделение лактатдегидрогеназы из сердца свиньи

Материалы и оборудование: 0,2 моль/л Na-фосфатный буфер (pH 7,2), 0,1 моль/л Na-фосфатный буфер (pH 7,2), 0,1 моль/л Na-фосфатный буфер (pH 7,5), сульфат аммония мелкоизмельченный, сульфат аммония (0,5 насыщения), ацетон, хлорид натрия (лед), хлорид кальция, концентрированный раствор аммиака, гомогенизатор ("Homogenizer type 302", Польша), магнитная мешалка, центрифуга MPW-360, центрифужные пробирки, стеклянная посуда, фильтровальная бумага.

Ход работы

Для приготовления кальций-фосфатного геля к 0,5 л 0,44 моль/л Na_2HPO_4 при энергичном перемешивании быстро добавить 0,5 л 0,66 моль/л CaCl_2 . Концентрированным раствором аммиака довести pH раствора до значений 8,2—8,6. Полученную суспензию поместить в стеклянный цилиндр объемом 2 л, налить бидистиллированную воду и перемешать. После оседания геля жидкость декантировать. Оставшуюся суспензию вновь залить водой, перемешать и отстаивать. Аналогичную процедуру повторять до тех пор, пока в промывных водах не исчезнут ионы хлора. После этого общий объем суспензии довести водой до 1 л. Гель надо готовить за 1—2 дня до использования и хранить в холодильнике.

Все работы с растворами фермента необходимо проводить на ледяной бане и в холодной комнате.

Экстракция. Охлажденные свиные сердца освободить от жировой и соединительной ткани и гомогенизировать при 10000 об/мин ("Homogenizer type 302", Польша). Около 400 г измельченной ткани залить 1,5 л холодной бидистиллированной воды, перемешать в течение 20 мин при помощи магнитной мешалки, отжать через несколько слоев марли и фильтровать для удаления жира через стеклянную вату.

Обработка кальций-фосфатным гелем. К экстракту при перемешивании добавить 0,3 л суспензии кальций-фосфатного геля. Перемешивание продолжать еще 5 мин и затем отстаивать. Через 30 мин прозрачную жидкость над осадком просифонировать и отбросить, а оставшуюся суспензию центрифугировать 15 мин при 2000 g на рефрижераторной центрифуге MPW-360 (Польша).

К осадку добавить 0,2 л 0,2 моль/л фосфатного буфера с pH 7,2, перемешать до получения однородной суспензии и центрифугировать 15 мин при 2000 g. Надосадочную жидкость слить, а к осадку добавить 0,15 л 0,2 моль/л фосфатного буфера (pH 7,2). Тщательно перемешать и центрифугировать 15 мин при 2000 g.

Первое осаждение сульфатом аммония. К объединенным центрифугатам, полученным на предыдущей стадии, при перемешивании отдельными порциями добавить сульфат аммония до 0,6 насыщения. Перемешивать еще 15 мин, затем центрифугировать при 2600 g в течение 30 мин.

Первое осаждение ацетоном. Осадок растворить в 40 мл 0,1 моль/л фосфатного буфера с pH 7,2 и к полученному раствору добавить предварительно охлажденный до -15°C ацетон в количестве 60,4 мл на каждые 100 мл ферментативного раствора. Поднять температуру до 13°C и инкубировать смесь 10 мин, затем центрифугировать при 2600 g в течение 15 мин. К осадку добавить 20 мл сульфата аммония 0,3 насыщения. Перемешать до получения однородной суспензии и через 30 мин центрифугировать 40 мин при 2600 g.

Второе осаждение сульфатом аммония. К центрифугату добавить сульфат аммония до 0,5 насыщения. Перемешать в течение 10 мин и оставить в холодильнике на 6—8 ч. Центрифугировать 40 мин при 2600 g и осадок растворить в 5,5 мл холодной бидистиллированной воды.

Второе осаждение ацетоном. К ферментному раствору, как и в первый раз, добавить ацетон, охлажденный до -15°C . Температуру поднять до 18°C , выдержать 10 мин, затем центрифугировать 15 мин при 2600 g. Осадок суспендировать в 2 мл сульфата аммония 0,3 насыщения.

Кристаллизация. К ферментному раствору присыпать сульфат аммония до 0,5 насыщения. Перемешать и оставить в холодильнике на ночь. Центрифугировать 20 мин при 2600 g и осадок растворить в сульфате аммония 0,3 насыщения. К суспензии добавить сульфат аммония до 0,5 насыщения. Описанную процедуру повторить три раза. Суспензию кристаллов фермента хранить в холодильнике.

В процессе выделения ЛДГ содержание белка на различных стадиях необходимо контролировать по методу Лоури (см. лабораторную работу № 2).

Степень гомогенности полученного препарата анализируют методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле (см. лабораторную работу № 20).

Лабораторная работа № 20

Исследование изоферментного спектра лактатдегидрогеназы методом электрофореза в полиакриламидном геле

Определение изоферментов ЛДГ методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле основано на различиях в зарядовом состоянии и электрофоретической подвижности молекул разных изоформ белка.

Материалы и оборудование: соляная кислота, трисгидроксиметиламинметан (трис), ТЕМЕД, акриламид, бисакриламид (БИС), персульфат аммония, рибофлавин, сахараза, бромфеноловый синий, феназинметасульфат, нитросиний тетразолиевый, хлорид магния, хлорид натрия, фосфатный буфер (рН 7,4), NADH, лактат натрия, уксусная кислота, парафин, установка для диск-электрофореза, термостат, денситометр, ртутно-кварцевая лампа.

Ход работы

Для получения мелкопористого (5,5 %) геля, в котором осуществляется разделение веществ в соответствии с их зарядом и молекулярной массой, необходимо смешать 1 объем раствора $A_{\text{ц}}$ (48 мл 1 н HCl, 36,6 г трис и 0,23 мл ТЕМЕД на 100 мл бидистиллированной воды), 2 объема $B_{\text{ц}}$ (28 г акриламида и 0,735 г БИС в 100 мл дистиллированной воды), 4 объема раствора $2_{\text{ц}}$ (0,14 %-ный раствор персульфата аммония) и добавить 1 объем дистиллированной воды. Осторожно перемешав стеклянной палочкой полученную смесь, внести по 2 мл ее в каждую трубку (один конец трубки заклеить и загерметизировать расплавленным парафином). Для предотвращения ингибирования молекулярным кислородом процесса полимеризации геля и формирования ровной поверхности последнего сверху раствора наложить бидистиллированную воду на высоту 5—7 мм. Процесс полимеризации заканчивается через 30—40 мин, о чем свидетельствует появление четкой границы раздела между гелем и водой и легкое нагревание трубок.

На слой разделяющего геля нанести 0,2 мл концентрирующего крупнопористого геля (7 %), который готовят смешиванием 1 объема $B_{\text{ц}}$ (24 мл 1 н HCl, 2,99 г трис и 0,23 мл ТЕМЕД на

50 мл бидистиллированной воды), 2 объемов раствора $\Gamma_{\text{ш}}$ (5 г акриламида и 1,25 г БИС в 50 мл воды), 1 объема $\Delta_{\text{ш}}$ (0,004 %-ный раствор рибофлавина) и 4 объемов раствора $E_{\text{ш}}$ (40 %-ный раствор сахарозы). Полимеризация протекает за 10—15 мин в условиях облучения светом ртутно-кварцевой лампы. Для исключения контакта с кислородом воздуха на гель также аккуратно наслоить воду на высоту 3—5 мм.

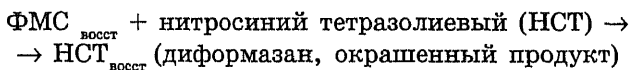
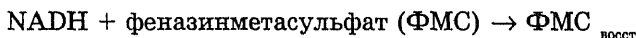
С поверхности заполимеризовавшегося концентрирующего геля удалить воду и внести образец (смесь изоферментов ЛДГ, разведенную 40 %-ным раствором сахарозы в отношении 1:1) в количестве 0,2 мл. Наслоить раствор лидирующего красителя (0,001 %-ный раствор бромфенолового синего). Эта часть колонки непосредственно соприкасается с электродным буфером при электрофорезе, поэтому верхнее наслаивание заканчивается электродным буфером. Наслаивание проводят очень осторожно, избегая перемешивания образца с буфером, во избежание потери вещества.

Состав электродного буфера (рН 8,3): 6 г трис и 28,8 г глицина на 1 л бидистиллированной воды. Перед использованием его необходимо разбавить в 10 раз.

Собрать прибор для диск-электрофореза, поместить его в холодильник и подсоединить к соответствующим полюсам выпрямителя тока. Первые 15—20 мин электрофореза сила тока не должна превышать 0,002 А на каждую трубочку. Такая низкая величина тормозит движение мелких частиц образца в раствор верхнего сосуда. По истечении этого срока силу тока увеличить до 0,004—0,005 А на гель.

После окончания электрофореза извлеченные столбики поместить в красящую смесь для проявления изоферментов ЛДГ.

В основе тетразолиевого метода выявления локализации ферментов в гелях лежит образование нерастворимых хромогенных веществ — формазанов. Схематически их образование может быть представлено последовательностью реакций:



ФМС выступает в качестве переносчика электронов в цепи реакций.

В состав инкубационной среды входят 8 мл 1 моль/л раствора лактата натрия, 4 мл раствора NADH (10 мг/мл), 8 мл 0,1 моль/л раствора NaCl, 8 мл 0,005 моль/л раствора MgCl₂, 10 мл 0,05 моль/л фосфатного буфера (pH 7,4), 2 мл раствора ФМС (1 мг/мл) и 20 мл НСТ (1 мг/мл).

Каждый столбик ПААГ поместить в отдельную пробирку, залить инкубационной смесью и поставить в термостат при температуре 37 °С на 1—1,5 ч (или инкубировать при комнатной температуре в течение ночи). По истечении срока инкубации гели ополоснуть водой и перенести в пробирки, содержащие раствор уксусной кислоты (7 %). При температуре 5 °С и в темноте диск-электрофореграммы изоэнзимов ЛДГ могут сохраняться не более 7 дней. В течение этого срока их денситометрируют, изображают графически изоферментный спектр ЛДГ (по оси абсцисс — длина столбика геля, по оси ординат — оптическая плотность), затем определяют содержание каждого изофермента весовым методом.

Лабораторная работа № 21

Исследование УФ-чувствительности лактатдегидрогеназы в присутствии некоторых модифицирующих агентов

Материалы и оборудование: 0,1 моль/л Na-фосфатный буфер (pH 7,4), пируват натрия, NADH, буферный раствор лактатдегидрогеназы из сердца свиньи или скелетных мышц свиньи, спектрофотометр СФ-46, кварцевые кюветы, стеклянные пипетки и пробирки, фильтровальная бумага, секундомер, установка для УФ-облучения биосистем.

Ход работы

I вариант

Объектом исследования является готовый препарат фермента, обессоленный путем гель-хроматографии на сефадексе G-25 (см. лабораторную работу № 18). Преподаватель выбирает один из вариантов эксперимента. В качестве модифицирующего агента используется раствор:

- а) азида натрия ($3,2 \cdot 10^{-3}$ моль/л);
- б) D-маннита ($5,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л);
- в) серотонина ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л).

Затем необходимо провести определение функциональной активности:

- 1) нативного фермента (см. лабораторную работу № 18);
- 2) УФ-облученного в дозе 3,02 кДж/м² свободного фермента;
- 3) фермента в присутствии модифицирующего агента;
- 4) фермента, УФ-облученного в той же дозе в присутствии модификатора.

УФ-облучение образцов проводить согласно методике, описанной в лабораторной работе № 5. Данные представить в виде табл. 21.

Т а б л и ц а 21

*УФ-индуцированные изменения ферментативной активности
лактатдегидрогеназы в присутствии модифицирующего
агента*

Вариант опыта	Ферментативная активность ЛДГ, мкмоль/мин	Активность ЛДГ, % от активности нативного фермента
Нативный фермент		100 %
ЛДГ, УФ-облученная в свободном состоянии		
ЛДГ + модифицирующий агент		
ЛДГ, УФ-облученная в присутствии химического агента		

На основании полученных результатов сделать заключение о причинах и характере изменений величин ферментативной активности ЛДГ при УФ-облучении белка в свободном состоянии и в присутствии модификатора. Какое действие может оказывать модифицирующий агент (азид натрия, D-маннит, серотонин) на структурно-функциональное состояние белковой молекулы при УФ-облучении растворов исследуемого фермента?

II вариант

В качестве объекта исследования используют препарат фермента, полученный из сердечной мышцы свиньи по методике, описанной в лабораторной работе № 17.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Опишите методику выделения эритроцитарных мембран из крови доноров.
2. Какие химические реакции лежат в основе определения содержания белка в мембранных структурах по методу Лоури?

3. Какие принципы лежат в основе определения ферментативной активности мембраносвязанных ацетилхолинэстеразы и Na^+ , K^+ -АТФазы?

4. Что представляют собой флуоресцентные зонды? Назовите параметры, используемые для характеристики флуоресцентных зондов.

5. Каковы направления использования флуоресцентных зондов в мембранологии?

6. Что представляет собой спектр люминесценции вещества?

7. Почему люминесцентные свойства флуоресцентных зондов изменяются при связывании их с различными мембранными структурами?

8. Опишите физико-химические методы модификации биомембран.

9. Почему фосфолипазы относят к химическим модификаторам биомембран?

10. На каком основании каталазу относят к антиоксидантным ферментам?

11. Какие функции в клетке выполняет глутатионредуктаза?

12. Какие методы используют для обнаружения и доказательства фактов участия активных форм кислорода в УФ-превращениях биомакромолекул? Каковы их преимущества и недостатки?

СПИСОК ОСНОВНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки: В 3-х т. — М.: Мир, 1994. — Т. 1. — 517 с.

Антонов В. Ф. Липиды и ионная проницаемость мембран. — М.: Наука, 1982. — 151 с.

Артюхов В. Г., Башарина О. В., Вашанов Г. А., Наквасина М. А., Путинцева О. В. Олигомерные белки: структурно-функциональные модификации и роль субъединичных контактов. — Воронеж: Изд-во ВГУ, 1997. — 264 с.

Артюхов В. Г., Ковалева Т. А., Шмелев В. П. Биофизика: Учебное пособие. — Воронеж: Изд-во ВГУ, 1994. — 336 с.

Артюхов В. Г., Путинцева О. В. Оптические методы анализа интактных и модифицированных биологических систем. — Воронеж: Изд-во ВГУ, 1996. — 240 с.

Биологические мембраны. Методы / Под ред. Дж. Б. Финдлея, У. Г. Эванза. — М.: Мир, 1990. — 424 с.

Биофизика: Учебник / Под ред. П. Г. Костюка. — Киев: Выща шк., 1988. — 504 с.

Биохимическое исследование мембран / Под ред. Э. Мэдди. — М.: Мир, 1979. — 460 с.

Болдырев А. А. Биологические мембраны и транспорт ионов. — М.: Изд-во МГУ, 1985. — 208 с.

Введение в биомембранологию: Учебное пособие / Под ред. А. А. Болдырева. — М.: Изд-во МГУ, 1990. — 208 с.

Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М.: Наука, 1972. — 252 с.

Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. — М.: Наука, 1980. — 320 с.

Владимиров Ю. А., Потапенко А. Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов. — М.: Высшая школа, 1989. — 199 с.

Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции. М.: Мир, 1997. — 624 с.

Исков В. Г., Берестовский Г. Н. Динамическая структура липидного бислоя. — М.: Наука, 1981. — 293 с.

Исков В. Г., Берестовский Г. Н. Липидный бислой биологических мембран. — М.: Наука, 1982. — 224 с.

Кагава Я. Биомембраны. — М.: Высш. шк., 1985. — 303 с.

Конев С. В. Структурная лабильность биологических мембран и регуляторные процессы. — Минск: Наука и техника, 1987. — 240 с.

Крутецкая З. И., Лонский А. В. Биофизика мембран: Учебное пособие. — СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 1994. — 288 с.

Рошупкин Д. И., Артюхов В. Г. Основы фотобиофизики. — Воронеж: ВГУ, 1997. — 116 с.

Рубин А. Б. Биофизика: В 2-х кн. Кн. 2: Биофизика клеточных процессов. — М.: Высш. шк., 1987. — 303 с.

Твердислов В. А., Тихонов А. Н., Яковенко Л. В. Физические механизмы функционирования биологических мембран. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1986. — 189 с.

Фридрих П. Ферменты: четвертичная структура и надмолекулярные комплексы. — М.: Мир, 1986. — 374 с.

Черницкий Е. А., Воробей А. В. Структура и функции эритроцитарных мембран. — Минск: Наука и техника, 1981. — 216 с.

СПИСОК ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Аскари А. Регуляция Na-насоса липонуклеотидами: механизм и физиологическое значение // Биол. науки. — 1990. — № 6. — С. 7—15.

Болдырев А. А. Возможные причины нелинейности графиков Аррениуса для Na, K-зависимой аденозинтрифосфатазы. I. Роль мембранных липидов // Биомакромолекулы в методе спиновых меток и зондов. — М.: Наука, 1988. — С. 80—92.

Болдырев А. А. Na/K-АТФаза — свойства и биологическая роль // Соросовский образоват. журн. — 1998. — № 4. — С. 2 — 9.

Брокерхоф Х., Дженсен Р. Липолитические ферменты. — М.: Мир, 1978. — 282 с.

Владимиров Ю. А. Свободные радикалы в первичных фотобиологических процессах // Биол. мембраны. — 1998. — Т. 15, № 5. — С. 517—529.

Волотовский И. Д., Шейко Л. М., Конев С. В. Влияние состояния липидной фазы мембраны на эффективность фотохимической модификации эритроцитарной ацетилхолинэстеразы // Молек. биол. — 1978. — Т. 12, вып. 3. — С. 533 — 538.

Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. — М.: Наука, 1989. — 277 с.

Дубинина Е. Е. Антиоксидантная система плазмы крови // Укр. биохим. журн. — 1992. — Т. 64, № 2. С. 3 — 15.

Ермаков Г. Л. Надмолекулярная организация ферментных систем. I. Структурный аспект проблемы // Биохимия. — 1993. — Т. 58, вып. 5. — С. 659 — 674.

Есакова Т. В., Иванов М. В. Взаимодействие лактатдегидрогеназы и мембран саркоплазматического ретикулума // Биохимия. — 1992. — Т. 57, вып. 2. — С. 253—266.

Зензбуш П. Молекулярная и клеточная биология. — М.: Мир, 1982. — Т. 1. — С. 263—271.

Исследование активности ферментов углеводного обмена клеток головного мозга крыс в условиях лучевого поражения/ Б. Ф. Сухомлинов, Ю. С. Гринюк, Н. А. Сибирная и др. // Радиобиол. — 1990. — Т. 30, вып. 5. — С. 619—622.

Казеннов А. М., Маслова М. Н. Структурно-биохимические свойства мембраны безъядерных эритроцитов // Физиол. журн. им. И. М. Сеченова. — 1987. — Т. 73, № 12. — С. 1587 — 1598.

Кальнова Н. Ю. Количественное определение состава липидов эритроцитов и плазмы крови // Исследование синтетических и природных антиоксидантов *in vitro* и *in vivo*: Сб. науч. ст. — М.: Наука, 1992. — С. 95 — 99.

Кения М. В., Лукаш А. И., Гуськов Е. П. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе // Успехи соврем. биол. — 1993. — Т. 113, вып. 4. — С. 456—470.

Конев С. В., Волотовский И. Д. Фотобиология. — Минск: Изд-во Белорус. ун-та, 1979. — 383 с.

Конев С. В., Волотовский И. Д. Действие УФ-света на белки в растворе и в составе биологических мембран // Фотобиология животной клетки. — Л.: Наука, 1979. — С. 23—34.

Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. — М.: Высшая школа, 1980. — С. 71.

Красновский А. А., мл. Фосфоресцентный анализ синглетного молекулярного кислорода в фотобиохимических системах // Биол. мембр. — 1998. — Т. 15, № 5. — С. 530 — 548.

Красновский А. А., мл. Механизм образования и роль синглетного кислорода в фотобиологических процессах // Молекулярные механизмы биологического действия оптического излучения. — М.: Наука, 1988. — С. 23—41.

Круглякова К. Е., Шишкина Л. Н. Общие представления о механизме действия антиоксидантов // Исследование синтетических и природных антиоксидантов *in vitro* и *in vivo*: Сб. науч. ст. — М.: Наука, 1992. — С. 5—8.

Кулинский В. И. Активные формы кислорода и окислительная модификация макромолекул: польза, вред и защита // Соросовский образоват. журн. — 1999. — № 1. — С. 2—7.

Курганов Б. И. Принципы интеграции клеточного метаболизма // Молек. биол. — 1986. — Т. 20, вып. 2. — С. 369—377.

Курганов Б. И. Роль мультиферментных комплексов в интеграции клеточного метаболизма // Молек. биол. — 1986. — Т. 20, вып. 6. — С. 1530—1538.

Курганов Б. И., Любарев А. Е. Гипотетическая структура ферментов гликолиза (гликолитического метаболита), формирующегося на мембране эритроцитов // Молек. биол. — 1988. — Т. 22, вып. 6. — С. 1605—1613.

Курганов Б. И. Физико-химические механизмы регуляции активности ферментов. — М.: Наука, 1992. — 59 с.

Курганов Б. И., Любарев А. Е. Принципы организации и функционирования микрокомпартамента метаболита // Биохимия. — 1989. — Т. 54, вып. 5. — С. 716—718.

Лактатдегидрогеназа в диагностике инфаркта миокарда: диагностические и методические аспекты/ В. Н. Титов, В. А. Амелюшкина, Т. И. Коткина, А. В. Шапошников // Лабор. дело. — 1988. — № 11. — С. 31—41.

Ланкин В. З. Ферментативное перекисное окисление липидов // Укр. биохим. журн. — 1984. — Т. 56, № 3. — С. 317 — 331.

Литвинко Н. М., Кисель М. А. Эндогенные фосфолипазы A_2 : структура и функции. — Минск: Наука и техника, 1991. — 270 с.

Лопина О. Д. Na^+ , K^+ -АТРаза: структура, механизм и регуляция активности // Биол. мембр. — 1999. — Т. 16, № 6. — С. 584 — 603.

Луцак В. И. Взаимодействие лактатдегидрогеназы со структурными компонентами клетки: возможное физиологическое значение// Биохимия. — 1992. — Т. 57, вып. 8. — С. 1142—1154.

Луцак В. И. Характеристика связанной с микросомами лактатдегидрогеназы из белых мышц скота// Биохимия. — 1991. — Т. 56, вып. 12. — С. 2173—2180.

Меньщикова Е. Б., Зенков Н. К. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов // Успехи соврем. биол. — 1993. — Т. 113, вып. 4. — С. 442 — 455.

Мирошниченко О. С. Лектины и распознавание белковых лигандов// Укр. биохим. журн. — 1999. — Т. 71, № 5. — С. 5—9.

Норби Й. Представления об олигомерной структуре и функции Na , K -АТФазы, основанные на результатах изучения и связывания лигандов и определении размеров молекулярной мишени // Биол. науки. 1990. — № 6. — С. 120—131.

Перекисное окисление и радиация / В. А. Барабой, В. Э. Орел, И. М. Карнаух // Отв. ред. Гродзинский Д. М. — Киев: Наук. думка, 1991. — 256 с.

Пермяков Е. А. Кальцийсвязывающие белки. — М.: Наука, 1993. — 192 с.

Поглазов Б. Ф. Регуляторные функции актина в клетке// Известия АН СССР, Сер. биол. — 1983. — № 5. — С. 667—677.

Регуляция активности ферментов в адсорбционных ферментных системах. III. Взаимодействие лактатдегидрогеназы из мышц свиньи с F-актином/ Н. П. Сугробова, Т. Б. Еронина, Н. А. Чеботарева и др.// Молекул. биология. — 1983. — Т. 17, вып. 2. — С. 430—436.

Рошупкин Д. И. Молекулярные механизмы фотоповреждения биологических мембран // Фотобиология животной клетки. — Л.: Наука, 1979. — С. 23—34.

Рошупкин Д. И., Мурина М. А. Фотобиологические процессы в биомембранах при действии ультрафиолетового излучения на клетки, ткани и организм животных // Биофизика. — 1993. — Т. 38, вып. 6. — С. 1053—1068.

Рыскулова С. Т. Радиационная биология плазматических мембран. — М.: Энергоатомиздат, 1986. — 125 с.

Рязанов А. Г., Спирин А. С. Организация ферментов на внутриклеточных структурах: эстафета у поверхности // Биохимия. — 1989. — Т. 54, вып. 5. — С. 709—715.

Сапежинский И. И. Сенсибилизированное фотоокисление белков и других веществ. Возможное значение этих процессов в фотобиологии // Молекулярные механизмы биологического действия оптического излучения. — М.: Наука, 1988. — С. 92—101.

Ткачук В. А. Молекулярные механизмы нейроэндокринной регуляции // Соросовский образоват. журн. — 1998. — № 6. — С. 16—20.

Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов. — М.: Мир, 1989. — С. 344—356.

Филлипов П. П. Как внешние сигналы передаются внутрь клетки // Соросовский образоват. журн. — 1998. — № 3. — С. 28—34.

Фотопревращение мембранных липидов и его роль в изменении функций биомембран под действием УФ-излучения / Д. И. Рошупкин и др. // Молекулярные механизмы биологического действия оптического излучения. — М.: Наука, 1988. — С. 79—92.

Фридович И. Радикалы кислорода, пероксид водорода и токсичность кислорода // Свободные радикалы в биологии. — М.: Мир, 1979. — Т. 1. — С. 272—308.

Фут Х. Фотосенсибилизированное окисление и синглетный кислород. Биологическое действие // Там же. — Т. 2. — С. 96—143.

Холмогоров В. Е., Крыленков В. А., Османов М. А. Первичные фотопроцессы в крови и ее компонентах при действии оптического излучения // Молекулярные механизмы биологического действия оптического излучения. — М.: Наука, 1988. — С. 164—177.

Храпова Н. Ю. Перекисное окисление липидов и системы, регулирующие его интенсивность // Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. — М.: Наука, 1981. — С. 147—155.

Чаяло П. П., Протас А. Ф. Изоферментный спектр лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, эстеразы и кислой фосфатазы клеток головного мозга крыс в ранние сроки после внешнего γ -облучения в дозе 1 Гр // Радиобиол. — 1992. — Т. 32, вып. 6. — С. 815—819.

Черницкий Е. А., Воробей А. В. Фотосенсибилизированное повреждение биологических мембран // Молекулярные механизмы биологического действия оптического излучения. — М.: Наука, 1988. — С. 102—111.

Шинкаренко Н. А., Алесковский В. Б. Синглетный кислород, методы получения и обнаружения // Успехи химии. — 1981. — Т. 50, вып. 3. — С. 406—428.

Шляпиктох В. Я. Фотохимические превращения и стабилизация полимеров. — М.: Химия, 1979. — 344 с.

Шляпинтох В. Я., Иванов В. Б. Тушение синглетного кислорода// Успехи химии. — 1976. — Т 45, вып. 2. — С. 202—223.

Яковлев В. А. Кинетика ферментативного катализа. — М.: Наука, 1965. — 247 с.

Arnold H., Pette D. Binding of glycolytic enzymes to structure proteins of the muscle// Eur. J. Biochem. — 1968. — Vol. 6, № 2. — P. 163—171.

Association of integrated metabolic pathways with membranes. I. Glycolytic enzymes of the red blood corpuscle and yeast/ D. E. Green, E. Murer, H. O. Hultin et al.// Arch. Biochem. Biophys. — 1965. — Vol. 112. — P. 635—647.

Clarke F. M., Masters C. J. Multienzyme aggregates: new evidence for an association of glycolytic components// Biochim. et Biophys. Acta. — 1973. — Vol. 327, № 1. — P. 223—226.

Clarke F. M., Masters C. J. On the association of glycolytic enzymes with structural proteins of skeletal muscle// Biochem et biophys. acta. — 1975. — Vol. 381, № 1. — P. 37—46.

Melnick R. L., Hultin H. O. Studies on the nature of the subcellular localization of lactate dehydrogenase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in chicken skeletal muscle// J. Cell. Physiol. — 1973. — Vol. 81. — P. 139—148.

ПРОГРАММА СПЕЦКУРСА «БИОФИЗИКА МЕМБРАН»

Введение в мембранологию. Краткая история мембранологии. Мембрана — универсальный компонент биологических систем. Методы исследования биомембран: биохимические, физиологические, иммунологические, генетические, биофизические (дифракционные: рентгеновская дифракция, дифракция нейтронов; резонансные: ядерный магнитный резонанс, электронный парамагнитный резонанс; оптические: абсорбционная спектроскопия, флуоресценция и метод флуоресцентных зондов, дисперсия оптического вращения, круговой дихроизм, инфракрасная спектрофотометрия; дифференциальная сканирующая микрокалориметрия; метод радиоактивных меток; метод моделирования мембран).

Состав и структурно-функциональная организация молекулярных компонентов биомембран. Классификация, состав, структура, физико-химические и динамические свойства, функции мембранных липидов. Особенности липидного состава мембран клеток прокариот, эукариот и вирусов. Лиотропный и термотропный мезоморфизм липидов биомембран. Кинки, механизм их образования. Динамическая модель липидного бислоя. Структурная асимметрия липидов. Фазовые переходы липидов в мембране. Связь между фазовым состоянием липидов и функцией мембран.

Классификация, структура, функции и локализация мембранных белков. Структурно-функциональная организация мембранного каркаса эритроцитарной клетки. Характеристика основных белков эритроцитарной мембраны: спектрина, актина, белка полосы 3, гликофооринов и др. Понятие о векторных ферментах биомембран. Структура, функциональные и некоторые физико-химические свойства интегральных мембранных белков на примере Na^+ , K^+ -АТФазы и ацетилхолинэстеразы.

Характеристика углеводных компонентов биомембран. Использование углеводраспознающих белков — лектинов в мембранологии и медицине.

Структура и функции плазматических мембран на примере мембран эритроцитов.

Особенности межмолекулярных взаимодействий в мембранах. Физические основы внутримембранных взаимодействий. Липид-липидные, белок-липидные и белок-белковые взаимодействия в мембранах, их роль в функционировании биомембран. Понятие об аннулярных липидах.

Развитие представлений о структурной организации биомембран. Модели биомембран: Даниэлли и Давсона, Робертсона, Зингера и Никольсона, Конева и сотр. и др.

Искусственные мембраны, липосомы и протеолипосомы, методы их получения, строение, свойства, применение в различных областях биологии и медицины. Взаимодействие липосом с клетками. Методы модификации природных и искусственных мембран.

Транспорт веществ через мембрану. Проницаемость биомембран. Проницаемость липидных мембран при фазовых превращениях липидов. Проницаемость липидных мембран для воды. Ионная проницаемость липосом. Влияние холестерина на ионную проницаемость биомембран. Методы изучения проницаемости. Движущие силы и механизмы процесса переноса вещества через мембрану. Электрохимический потенциал. Активный и пассивный транспорт. Термодинамические уравнения и критерии процессов пассивного и активного транспорта. Уравнения диффузии, проницаемости, константа проницаемости.

Ионный транспорт через селективные каналы. Классификация ионных каналов. Воротные механизмы действия потенциал-зависимых ионных каналов. Структурно-функциональная организация ионных каналов мембран (потенциалзависимые калиевые, натриевые, кальциевые каналы). Молекулярные основы функционирования систем первично-активного и вторично-активного транспорта. Структура, функциональные и физико-химические свойства Na^+ , K^+ -АТФазы и Ca^{2+} -АТФазы. АТФ как регулятор активного транспорта ионов Na и K . Механизм сопряжения гидролиза АТФ и Ca^{2+} -насоса. Липидный контроль за межсубъединичными взаимодействиями в олигомерных ансамблях транспортных АТФаз.

Индукцированный ионный транспорт. Подвижные переносчики (ионофоры). Использование ионофоров в исследованиях мембран и медицине.

Медицинские аспекты мембранологии. Свободнорадикальное пероксидное окисление липидов мембран в норме и при патологических процессах. Активные формы кислорода, механизм их образования, свойства, пути утилизации, роль в регулировании метаболических процессов в биосистемах. Антиоксиданты, их классификация, локализация, свойства, механизм биологического действия. Понятие о прооксидантах и окислительном стрессе.

Редокс-регуляция — один из механизмов регулирования метаболических процессов.

Участие компонентов биомембран в осуществлении и регулировании метаболических процессов в клетке. Общая характеристика процессов передачи информации в клетке. Понятие о первичных и вторичных мессенджерах. Классификация, особенности структурно-функциональной организации мембранных белков-рецепторов. Характеристика аденилатциклазного и фосфоинозитидного пути передачи сигнала в клетку. Роль ионов в осуществлении метаболических процессов с участием мембран. Адсорбционный тип регуляции метаболизма. Понятие о метаболоне, физиологическое значение его образования. Пространственно-структурная организация ферментных систем клетки (на примере гликолитического комплекса и цикла Кребса). Экспериментальные исследования взаимодействия ферментов гликолиза с различными структурными компонентами клетки. Модели структуры гликолитического комплекса в скелетных мышцах и на внутренней поверхности мембран эритроцитов. Эстафетный механизм работы ферментов в клетке. Механизмы регулирования функциональной активности векторных ферментов биомембран. Пути нейрогуморальной регуляции функций клеток.

Энергосопрягающие мембраны: определение, классификация, особенности строения и функционирования. Сопрягающие факторы, сопрягающие ионы.

Структурно-функциональные модификации молекулярных компонентов биомембран под воздействием физико-химических агентов (ионизирующего и УФ-излучения). Роль пероксидного фотоокисления липидов в фотоповреждении биомембран. Особенности фотохимических превращений мембранных белков (ферментов). Феномен фотохимической аллотопии. Понятие о фотосенсибилизаторах. Фотореакции типа I и II. Фотосенсибилизированное окисление белковых молекул с участием синглетного кислорода.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Качественный и количественный состав липидов различных организмов

Таблица 1

*Липидный состав плазматических мембран и оболочек
грамотрицательных бактерий *Salmonella typhimurium**

Фракция	Содержание,		Состав фосфолипидов		
	фосфоли- пидов	липополи- сахаридов	ФЭ	ФГ	КЛ
Общая	21	13	74,9	22,1	3,0
Плазматические мембраны:					
фракция I	37	1,8	60,3	33,3	6,4
фракция II	34	2,5	60,0	32,9	7,1
Наружная оболочка	18,5	19,7	81,3	17,1	1,6

Примечание. ФЭ — фосфатидилэтаноламин; ФХ — фосфатидил-
холин; ФС — фосфатидилсерин; ФГ — фосфатидилглицерин; ФИ —
фосфатидилинозитол; ФК — фосфатидная кислота; КЛ — кардиоли-
пин; СМ — сфингомиелин; лизоФХ — лизофосфатидилхолин

Таблица 2

Состав липидов эритроцитарных мембран

Вид животного	Содержание липидов, мол. %			
	холестерин	общие ганглиозиды	другие липиды	фосфолипиды
Кошка	26,8	8,8	3,1	61,3
Корова	27,5	5,5	2,2	64,8
Собака	24,7	11,8	10,9	52,6
Коза	26,2	5,7	17,9	50,2
Морская свинка	27,0	2,2	15,2	55,6
Лошадь	24,5	15,5	8,0	52,0
Свинья	26,8	3,3	10,1	59,8
Кролик	28,9	4,5	0,8	65,8
Крыса	24,7	6,3	2,0	67,0
Овца	26,5	7,8	2,5	63,2

Т а б л и ц а 3

Состав фосфолипидов эритроцитарных мембран

Вид животного	Содержание фосфолипидов, мол. %						
	ФХ	ФЭ	ФС	ФИ	ФК	СМ	ЛизоФХ
Крыса	47,5	21,5	10,8	3,5	0,3	12,8	3,8
Кролик	33,9	31,9	12,2	1,6	1,6	19,0	0,3
Свинья	23,3	29,7	17,8	1,8	0,3	26,5	0,9
Собака	46,9	22,4	15,4	2,2	0,5	10,8	1,8
Лошадь	42,4	24,3	18,0	0,3	0,3	13,5	1,7
Овца	—	26,2	14,1	2,9	0,3	51,0	—
Корова	—	29,1	19,3	3,7	0,3	46,2	—
Коза	—	27,9	20,8	4,6	0,3	45,9	—
Кошка	30,5	22,2	13,2	7,4	0,8	26,1	0,3
Морская свинка	41,1	24,6	16,8	2,4	4,2	11,1	0,3
Человек	28,9	27,2	13,0	1,3	1,3	2,2	26,6

Т а б л и ц а 4

*Жирнокислотный состав фосфолипидов
в эритроцитах человека и быка*

Жирная кислота	Содержание жирных кислот в фосфолипидах эритроцитов, мол. %						
	человека				быка		
	ФХ	СМ	ФЭ	ФС	СМ + ФХ	ФЭ	ФС
15:0	Следы	1	Следы	Следы	2,1	Следы	Следы
16:0	35,4	30,0	24,2	3,3	17,1	4,9	9,1
16:1	—	—	—	—	—	2,6	1,8
17:0	—	—	—	—	1,9	—	—
18:0	13,7	7,8	19,8	49,0	4,2	12,4	30,0
18:1	22,5	2,6	16,3	5,2	2,2	37,2	33,4
18:2	20,7	1,0	4,5	3,3	3,7	21,4	15,8
18:3	Следы	—	—	—	1,8	3,1	1,5
20:0	Следы	2,1	Следы	Следы	Следы	—	—
20:3	Следы	—	Следы	Следы	1,8	1,2	1,3
20:4	7,5	—	23,0	20,9	Следы	7,7	2,6
22:0	Следы	7,4	Следы	—	10,7	—	—
22:4	Следы	—	5,0	3,1	—	Следы	—
22:5	Следы	—	2,2	3,3	—	1,4	1,0
22:6	Следы	—	3,2	11,9	—	Следы	Следы
23:0	Следы	2,2	Следы	Следы	3,2	—	—
24:0	Следы	15,7	Следы	—	42,2	—	—
24:1	—	30,5	Следы	Следы	10,5	—	—

Т а б л и ц а 5

Липиды мембран печени крысы

Тип мембраны	Содержание липидов, мг на мг белка				Содержание липидов, % от суммы		Молярное отношение холестерина/фосфолипиды		
	Общие	Фосфолипиды	Нейтральные	Холестерин	Фосфолипиды	Нейтральные			
Плазматическая	0,994	0,672	0,322	0,128	68	32	0,38		
Аппарат Гольджи	1,166	0,825	0,341	0,078	71	29	0,19		
Митохондриальные	0,202	0,175	0,027	0,003	87	13	0,034		
Тип мембраны	Состав фосфолипидов, % от общего фосфора								
	ФХ	ФЭ	СМ	КЛ	ФС	ФИ	ФК	ЛизоФХ	ЛизоФЭ
Плазматическая	39,3	23,3	16,0	1,0	9,0	7,7	0,5	1,0	1,3
Аппарат Гольджи	49,6	19,6	7,6	1,2	5,6	12,2	0,4	1,4	1,6
Митохондриальные	40,3	34,6	0,5	17,8	1,7	4,6	—	—	0,6

Т а б л и ц а 6

*Липидный состав мембран саркоплазматического ретикулу-
ма скелетных мышц некоторых животных*

Вид животного	Содержание липидов			Состав фосфолипидов, % от суммы				
	общих, % сухой массы	фосфолипидов, % от суммы	холестерин, % от суммы	ФХ	ФЭ	СМ	ФС	ЛизоФХ
Кролик	22—25	72—90	8—10	68—70	15—17	4—8	3—7	≈3
Омар	36	90	10	70	17	4	7	Следы
Рак	28	70	6	65	22	8	2	3

Приготовление буферных растворов

Таблица 7

Фосфатный буфер, 0,1 моль/л

Двузамещенный фосфат натрия ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), относит. мол. масса 178,05; однозамещенный фосфат натрия ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), относит. мол. масса 138. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 200 мл.

pH	0,2 моль/л раствор Na_2HPO_4 , мл	0,2 моль/л раствор NaH_2PO_4 , мл	pH	0,2 моль/л раствор Na_2HPO_4 , мл	0,2 моль/л раствор NaH_2PO_4 , мл
5,8	8,0	92,0	7,0	61,0	39,0
6,0	12,3	87,7	7,2	72,0	28,0
6,2	18,5	81,5	7,4	81,0	19,0
6,4	26,5	73,5	7,6	87,0	13,0
6,6	37,5	62,5	7,8	91,5	8,5
6,8	49,0	51,0	8,0	94,7	5,3

Таблица 8

Трис-НСI-буфер, 0,05 моль/л

Трис (трисгидроксиметиламинометан), относит. мол. масса 121,14. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 100 мл

pH при температуре		0,2 моль/л раствор трис, мл	0,1 моль/л раствор HCl, мл	pH при температуре		0,2 моль/л раствор трис, мл	0,1 моль/л раствор HCl, мл
23 °C	37 °C			23 °C	37 °C		
9,10	8,95	25	5,0	8,05	7,90	25	27,5
8,92	8,78	25	7,5	7,96	7,92	25	30,0
8,74	8,60	25	10,0	7,84	7,73	25	32,5
8,62	8,48	25	12,5	7,77	7,63	25	35,0
8,50	8,37	25	15,0	7,66	7,52	25	37,5
8,40	8,27	25	17,5	7,54	7,40	25	40,0
8,32	8,18	25	20,0	7,20	7,22	25	42,5
8,23	8,10	25	22,5		7,05	25	45,0
8,14	8,00	25	25,0				

Т а б л и ц а 9

*Ацетатный буфер, 0,2 моль/л*Ацетат натрия ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$), относит. мол. масса 136,09

pH	0,2 моль/л раствор ацетата натрия, мл	0,2 моль/л раствор уксус- ной кислоты, мл	pH	0,2 моль/л раствор ацетата натрия, мл	0,2 моль/л раствор уксус- ной кислоты, мл
3,6	0,75	9,25	5,0	5,90	4,10
3,8	1,20	8,80	5,2	7,00	3,00
4,0	1,80	8,20	5,4	7,90	2,10
4,2	2,65	7,35	5,6	8,60	1,40
4,4	3,70	6,30	5,8	9,10	0,90
4,6	4,90	5,10			

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Агонист 70
 Аддуцин 76
 Аденилатциклаза 35, 71, 222
 Аденилатциклазный путь передачи информации 71
 Азид натрия 186—200
 Активные формы кислорода 107—114
 F-Актин 31, 32, 33, 82
 Акцепторы $^1\text{O}_2$ 136—138
 Алкоксильный радикал 103, 107—109
 Аллотопный фермент 55
 Альдолаза 82, 83, 85
 Аминоацилфосфолипиды 16
 γ -Аминomásляная кислота 98
 Амплификация сигнала 68
 АМР циклический (сАМР) 35, 65, 71, 87
 1-Анилинафталин-8-сульфонат 183, 248—252
 Анкирин 30, 31, 32
 Аннулярные липиды 59
 Антиоксиданты 114—124
 Апоптоз 76
 Аскорбиновая кислота 108, 109, 120, 121, 157—169
 АТФазы: 29, 34
 — E_1E_2 -тип 36
 — H^+ 29, 36
 — K^+ 36
 — Na^+/K^+ : 35, 36, 91—94, 222
 — изоферменты 40
 — каталитические свойства 43, 44, 45, 47
 — локализация 37
 — механизм действия 41, 42, 44, 48
 — молекулярная масса 39
 — определение активности 241—243
 — особенности фотохимических превращений 169—172
 — структура 37, 38
 — фосфолипидный и углеводный состав 39
 — функции 36, 37
 — Ca^{2+} 36, 76, 77, 222
 Аутотрансфузия УФ-облученной крови (АУФОК) 8, 142
 Ацетилгалактозамин 56
 Ацетилглюкозамин 56
 Ацетил- β -метилхолин 51
 Ацетилхолин 50, 51, 98
 Ацетилхолиновый рецептор 70
 Ацетилхолинэстераза: 30, 50
 — активный центр 51
 — каталитические свойства 52, 54
 — локализация 51
 — механизм действия 51, 53
 — определение активности 237—238
 — особенности фотохимических превращений 149—169
 — структура 54, 55
 — функция 50, 51
 Бактериородопсин 29
 Бактериохлорофиллы 136
 Белки мембранные:
 — интегральные 27, 28, 29
 — классификация 27
 — периферические 27
 — поверхностные 27
 — собственно периферические 27
 — содержание 26, 27
 — функции 27
 — эффекторные 68
 Белок-белковые взаимодействия 61
 Белок полосы 3 32, 35, 85, 86
 Бензиловый спирт 149—156
 Бензоилхолин 51
 Бимолекулярный липидный слой:
 — ламеллярная гелевая фаза 19, 20
 — ламеллярная жидкокристаллическая фаза 19, 20
 Бутирилхолин 51
 Векторные ферменты 35, 91
 Вторично-активный транспорт 75
 Вторичные мессенджеры 64
 Галактоза 56
 Галактозамин 56
 Ганглиозиды 12, 14
 G-белки: 67
 — белки-мишени 67
 — классификация 69
 — молекулярная масса 69
 — свойства 69
 — функции 68, 69
 GDP 67
 Гексокиназа 83
 Гемоглобин 35, 84
 Гемолиз эритроцитов 252
 Гиалуроновая кислота 56
 Гидроксильный радикал 103, 108—110
 Гидропероксиды липидов 103, 127

Гипогалоиды 107—109
 Гистидин 186—200
 Гликозилфосфатидилинозитол 30
 Гликолипиды 11, 14, 56
 Гликолитический комплекс 84—87
 Гликопротеины 56
 Гликофинголипиды 15, 56
 Гликофорины: 29
 — А 32, 34
 — В 32
 — С 32
 Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогена-
 за 82, 83, 85
 Глицерофосфолипиды 13, 14
 Глутамат 98
 Глутатион 108, 109, 117, 118, 122
 Глутатионпероксидаза 108, 117, 118
 Глутатионредуктаза 117, 118
 Глутатионтрансфераза 117, 118
 Глюкоза 56
 Глюкозамин 56
 Глюкозо-6-фосфатаза 222
 Глюкозо-6-фосфатизомераза 85
 Глюкуроновая кислота 56
 3,5-GMP циклический (сGMP) 65
 Гомогенизаторы Даунса и Поттера 217
 Гомогенизация мембран 217
 Гормоны: 99
 — белковые 67
 — гонадотропные 67
 — низкомолекулярные 67
 — пептидные 67
 GTP 67

 Дезоксихолат натрия 226—227
 Детергенты: 224
 — агрегационное число 225
 — критическая концентрация
 мицеллообразования (ККМ) 225
 — свойства 224—227
 — структурные формулы 226
 Диацилглицерол (DG) 65, 72, 73
 Диметилазы 157
 1-Диметиламино-5-нафталиносультро-
 хлорид (DANS) 249—252
 Дисперсия оптического вращения 214
 Дифракция:
 — нейтронов 204
 — рентгеновская 204
 Додецилсульфат натрия 31, 221,
 226—227

 Енолаза 83, 85

Жирные кислоты:
 — арахидоновая 16, 65, 104
 — линолевая 16
 — линоленовая 16
 — миристиновая 16, 30
 — олеиновая 16
 — пальмитиновая 16, 30
 — стеариновая 16
 Жирорастворимые витамины 11

 Закон Вавилова 210
 Закон Стокса-Ломмеля 210

 Излучение:
 — ионизирующее 102, 142—149
 — ультрафиолетовое (УФ-) 102, 126
 Иммуоблоттинг 202
 Инозит 13
 Инозитол-1,4,5-трифосфат (IP_3) 65, 72, 73
 Инфракрасная спектроскопия
 (ИК-спектроскопия) 213
 Инфракрасный дихроизм
 (ИК-дихроизм) 213
 Ионная регуляция 74
 Ионы:
 — K^+ 75
 — Na^+ 75
 — Mg^{2+} 75
 — Ca^{2+} 65, 73, 75, 76, 77
 Ионные каналы: 97—98
 — воротная функция 98
 — лигандуправляемые 70
 — потенциалуправляемые 98
 — рецепторуправляемые 98
 — селективность 98
 Ионифор 77

 Кальбиндин 76
 Кальмодулин 73, 76, 77
 Кальренин 76
 Каналообразователи 236
 Кардиолипиды 12, 14
 β -Каротин 186—200
 Каротиноиды 109
 Каталаза 108, 116, 222
 Квантовый выход фотохимической
 реакции 131
 Кинки 23
 Кинуренин 185
 Кислая РНКазы 222
 Кислая фосфатаза 222
 Кластеры 24, 25
 Коллаген 27

- Комплекс с переносом заряда 137
 Конканавалин А 57, 149—156
 Константа скорости тушения $^1\text{O}_2$ 137
 Конформация углеводородных цепей липидов:
 — гом 22, 23
 — транс 22, 23
 — цис 22, 23
 Коэффициент седиментации 217
 Крауны 236
 Креатинфосфокиназа 27
 Критическая концентрация мицеллообразования (ККМ) 19
 Круговой дихроизм 215
- Лактатдегидрогеназа: 82, 85, 172, 222
 — изоферменты 173
 — каталитические свойства 174, 175
 — локализация 174—180
 — молекулярная масса 173
 — особенности фотохимических превращений 180—200
 — свойства 174—180
 — структура 173
 — функции 173
 Лактопермеаза 29
 Ламинин 27
 Лейкотриены 104
 Лектины 57, 58
 Лиганд-рецепторные взаимодействия 67
 Лизолецитин 16
 Лизофосфолипиды 12, 14
 Липиды:
 — амфипатические свойства 19
 — амфифильные (дифильные) 11
 — гексагональные структуры 20, 21
 — динамические свойства 22, 24
 — кислые 15
 — классификация 11, 15
 — латеральная диффузия 22
 — мицеллярные структуры 19, 20, 21
 — нейтральные 11, 15
 — содержание 16, 17, 18
 — состав 13, 14, 16
 — структура 13, 14
 — структурная асимметрия 25
 — трансислойный переход (“флип-флоп”) 22
 — фазовые переходы 21
 — физико-химические свойства 19
 — функции 26
 — цвиттерийонные 15
 Липид А липополисахарида 16
- Липид-белковые взаимодействия 59
 Липоксины 104
 Липооксигеназа 104—105
 Липофилин 28
 Люминесценция:
 — вынужденная 209
 — поляризованная 211
 — поляризационные спектры 211
 — резонансная 209
 — рекомбинационная 209
 — спектр возбуждения 209
 — спектр испускания 209
 — спонтанная 209
- D-Маннит 186—200
 Манноза 56
 Маркерный фермент 222
 Мезоморфизм:
 — лиотропный 19
 — термотропный 19, 20
 Мезоморфные структуры 21, 22
 Мембрана:
 — внутриклеточных органоидов 17, 18, 25, 28
 — митохондриальная 17, 18
 — плазматическая 17, 18
 — эритроцитарная 17, 25, 31
 Мембранный каркас (скелет) 31
 Метаболон: 82
 — модели структуры 84, 85
 — физиологическое значение образования 85
 Метод Лоури 232
 Методы исследования биомембран:
 — биофизические 203
 — биохимические 202
 — генетические 203
 — дифракционные 203
 — иммунологические 202
 — моделирования и получения искусственных мембран 216
 — оптические 208
 — резонансные 205
 — физиологические 202
 — электронной микроскопии 207
 Механизмы регулирования активности ферментов: 78
 — адсорбционный 81, 82
 — аллостерический 81
 — изостерический 80
 Миелопероксидазная реакция 111
 Микрокалориметрия 215
 Микрокомпартмент 88

Моноаминоксидаза 222
 Моноацилглицериды 11
 Мочевая кислота 108—109, 122
 Мукополисахариды 56
 Мультиферментные комплексы 83
 Мускарин 99

 NAD-пирофосфорилаза 222
 NADPH-дегидрогеназа 222
 NADPH-цитохром- b_5 -редуктаза 30
 Натриевый насос 47
 Нейрогуморальная регуляция функций клеток 97—100
 Нейромедиаторы 64, 98
 5'-нуклеотидаза 30, 222

 Окислительный стресс 113
 Окклюдируемые катионы 43
 Оксигеназы микросомальные 104
 β -D-Октилглюкозид 226—227
 Онкомодулин 76
 Оптическая активность 214

 Первично-активный транспорт 40
 Первичные мессенджеры 64
 Пергидроксильный радикал 107, 108
 Пероксидаза 116
 Пероксид водорода 108—110
 Пероксидный радикал 103, 107—109
 Пероксидное окисление липидов 102—106
 Пероксидное фотоокисление липидов 126—128
 Пиридин нуклеотиды 133, 151
 Пируваткиназа 82, 85
 Пируватоксидаза 29
 Плазмалоген 12, 14
 Полислии Легмюра-Бложе 216
 Поперечное сечение фотоинактивации 131
 Порин 27
 Порфирины 133
 Правило:
 — Каши 210
 — Стокса 210
 Проксиданты 113
 Пропандиол 16
 Простагландины 104
 Простаггелин 104
 Протеинкиназа:
 — С 26, 73
 — cAMP-зависимая (А-киназа) 30, 72
 Процессинг 56

Радиоллиз воды 143
 Реакция биуретовая 235
 Реакция Габер—Вейса 110, 116
 Реакция Фентона 108, 116
 Редокс-регуляция 113
 Рентгеноструктурный анализ 203
 Ретиналь 136
 Рецепторы: 65
 — классификация 66
 — свойства 66, 70
 — структура 65, 67, 70
 — функции 65, 67, 70
 Родопсин 29, 30

 Сахароза 219
 Серотонин 186—200
 Сефароза 4 В 232
 Сиаловые кислоты 12, 15
 Синглетный кислород $^1\text{O}_2$ 107—111, 134—138
 Ситостерин 12, 15
 Спектрин 31, 32, 33
 Спиновая метка 206
 Спиновый зонд 206
 Степень поляризации люминесценции 211
 Стереоспецифическая нумерация липидов 14
 Стероиды 11, 15
 Стигмастерин 12, 15
 Сукцинатдегидрогеназа 29
 Сульфопереброзиды (сульфатиды) 15
 Супероксиддисмутаза 108, 115—116
 Супероксидный анион-радикал 107—110
 Сфингозин 14
 Сфингомиелин 12
 Сфингофосфолипиды 13, 14

 Твин 80 227
 Темновое автоокисление липидов 128
 Тирозин 119, 130
 α -Токоферол 108—109, 119
 Трансляция 70
 Трансферрин 112, 116
 Тризофосфатизомераза 83, 85
 Триптофан 119, 130
 Тритон X-100 31, 225—227
 Тромбоксаны 104
 Тропомиеозин 82, 85
 Тропонин С 85
 Тушение $^1\text{O}_2$ макромолекулами:
 — физическое 137

— химическое 137
 Тушители синглетного кислорода
 136—138

Уабаин 36, 38, 49
 Убихинон 108, 109

Фенилаланин 119, 130
 Феофитин 136
 Ферритин 115
 Фибронектин 27
 Фиколл 219
 Флавины 133, 136, 151
 Флавоноиды 120
 Форболовые эфиры 74
 Формилкинурины 185
 Фосфатидилглицерин 13, 16
 Фосфатидилинозитол 13, 16
 Фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат 73
 Фосфатидилсерин 13, 16, 73
 Фосфатидилхолин 13, 14, 16
 Фосфатидилэтаноламин 13, 14, 16
 Фосфатидная кислота 16
 3-Фосфоглицераткиназа 83, 85
 Фосфоглицеромутаза 85
 Фосфоинозитидный путь передачи информации 72
 Фосфолипиды: 29, 157
 — A₁ 158
 — A₂ 157, 158
 — B 158
 — C 73
 — D 157—169
 Фосфолипиды 11, 13
 Фосфорная кислота 13
 Фосфофруктокиназа 82, 83, 85
 Фотодинамическое действие 134
 Фотоионизация аминокислот 129
 Фотолиз липидов 128
 Фотопротектор 190
 Фотосенсибилизатор 133
 Фотосенсибилизированные реакции 133
 Фотохимическая аллотопия 132
 Фоточувствительность 131

Химический сдвиг 205
 Хлорофиллы 136
 Холат натрия 226, 227
 Холестерин 12, 15
 Холин 13
 Холинэстераза 50, 51

Хроматография:
 — адсорбционная 220
 — аффинная 221
 — гель-проникающая 220
 — распределительная 220
 — тонкослойная 228
 Хромофорные группы 126
 Хондроитинсульфат 56

Цвиттергент 226, 227
 Центрифугирование:
 — зональное 217
 — изопикническое 218
 Цереброзиды 12, 14
 Церулоплазмин 108, 109, 116
 Циклооксигеназы 104—105
 Цитоскелет 31, 34
 Цитохром:
 — C 27
 — b₅ 29, 59
 Цитохром-с-редуктаза 222
 Цитохромоксидаза 29, 222

Щелочная фосфатаза 29, 30, 222

Эйкозаноиды 104, 157
 Экстраклеточный матрикс 27
 Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) 206
 Электрофорез 221
 Эндоваскулярное лазерное облучение крови (ЭЛОК) 8, 142
 Эстафетная модель работы ферментов в клетке 88
 Этаноламин 13
 Этиленгликоль 16

Ядерный магнитный резонанс (ЯМР)
 205

Учебное издание

**Артюхов Валерий Григорьевич,
Наквасина Марина Александровна**

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ:
СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ, ФУНКЦИИ,
МОДИФИКАЦИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМИ
АГЕНТАМИ**

Редактор *В. В. Пушкаренко*
Художественный редактор *Л. А. Клочков*
Электронная верстка *К. П. Пенского*
Корректор *Н. Н. Масленникова*

ИБ № 2600

ЛР 040088 от 24.03.97. Подп. в печ. 16.08.2000.

Форм. бум. 60х84/16. Бумага офсетная № 1. Офсетная печать.

Усл. печ. л. 17,2. Уч.-изд. л. 17,8.

Тираж 800. Заказ 3788.

Издательство Воронежского государственного университета

394000 Воронеж, ул. Ф. Энгельса, 8

Издательско-полиграфическая фирма «Воронеж»

394000 Воронеж, пр. Революции, 39